

Thiosulfatdesulphydrase und Sulfitreduktase
zwei Enzyme des Schwefelstoffwechsels
der Bäckerhefe

von

AXEL LEZIUS

Thiosulfatdesulphydrase und Sulfitreduktase
zwei Enzyme des Schwefelstoffwechsels
der Bäckerhefe

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Axel Lezius
aus
Hamburg
November 1959



5349 / 60

Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.1959

Meiner Mutter zugeeignet

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von
November 1957 bis August 1959 am Max-Planck-Institut für
Zellchemie in München unter der wissenschaftlichen Leitung
von Herrn Prof. Dr. F. Lynen ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. F. Lynen
möchte ich an dieser Stelle meinen Dank für das fördernde
Interesse aussprechen, das er stets dieser Arbeit entgegen-
brachte.

Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für die Gewährung
eines Stipendiums.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung und Problemstellung.....	1
B. Hauptteil.....	10
I. Die Thiosulfatdesulphydrase resp. Rhodanese der Bäckerhefe.....	10
1. Die Freisetzung von Schwefelwasserstoff aus Thiosulfat durch Hefe.....	10
a) Historisches. Entdeckung durch Beijerinck und Buchner; Versuche von Neuberg und Welde.....	10
b) Eigene Versuche an gefrieraufgeschlossenen Hefezellen und zellfreien Präparaten.....	11
2. Glutathion und Cystein, die Wasserstoffdonatoren der Thiosulfatdesulphydrase.....	16
3. Die nichtenzymatische Reaktion zwischen Thio- sulfat und Cystein unter Bildung von Schwe- felwasserstoff.....	20
4. Wahl des Hefeaufschlusses und Gewinnung eines enzymatisch aktiven Trockenpulverpräparates...	22
5. Optischer Test der Thiosulfatdesulphydrase durch Koppelung mit dem TPNH-Glutathion- reduktase System.....	24
6. Stöchiometrie der Reaktion.....	27
7. Cysteinsulfosäure - kein Zwischenprodukt der enzymatischen Reaktion.....	31
8. Weitere zum Schwefelstoffwechsel gehörende Enzymreaktionen, die durch das Trocken- pulverpräparat katalysiert werden.....	36

a) β -Mercaptobrenztraubensäure-desulphydrase....	37
b) β -Mercaptobrenztraubensäure-Cyanid-Trans-sulfurase.....	38
c) Thiosulfat-Cyanid-Transsulfurase (Rhodanese)	40
d) β -Mercaptobrenztraubensäure-Sulfit-Trans-sulfurase.....	43
9. Versuche zur Anreicherung der Thiosulfatdesulphydrase resp. Rhodanese mittels moderner Methoden der Chromatographie an Harz- und Cellulose-austauschersäulen.....	44
a) Papierelektrophorese des Trockenpulverpräparates.....	44
b) Adsorption an Amberlite IRC 50 XE 64.....	45
c) Adsorption an Carboxymethyl- und DEAE-Cellulose.....	51
10. SH-Bedarf der gereinigten Heferhodanese.....	54
11. Vergleich der Thiosulfatdesulphydrase- und Rhodaneseaktivität.....	57
12. Hemmung der Rhodanese und Thiosulfatdesulphydrase durch Sulfit.....	58
II. Die Sulfitreduktase der Bäckerhefe.....	60
1. Theoretische Einführung in das Problem.....	60
2. Der Einbau von markiertem Sulfit-Schwefel in Cystein durch zellfreie Extrakte aus Bäckerhefe.....	62
3. Nachweis von radioaktivem Schwefelwasserstoff nach Inkubation von Hefeextrakt mit isotonenmarkiertem Sulfit.....	63
4. Kolorimetrische Erfassung von entstandenem Schwefelwasserstoff.....	65
5. Sulfitreduktion durch zellfreie Hefepräparate..	67
6. Definition der Enzymeinheit.....	69

7. Vorläufige Anreicherung der Sulfit- reduktase.....	70
8. Der optische Test der Sulfitreduktase.....	71
9. Alkalischer Toluolaufschluss und Butanolauf- schluss nach Morton.....	74
10. Vorversuche zur weiteren Anreicherung des Enzyms.....	77
11. Versuche zur Charakterisierung des Enzyms.....	79
III. Diskussion der Ergebnisse.....	81
1. Zum enzymatischen Mechanismus der Sulfit- reduktion.....	81
2. Bedeutung und Mechanismus der Thiosulfatdesulf- hydrase.....	82
C. Beschreibung der Versuche.....	84
I. Hilfsenzyme und Substrate.....	84
II. Quantitative Bestimmung von Reaktionsprodukten....	86
III. Messung von Enzymaktivitäten.....	87
IV. Darstellung der Enzympräparate.....	89
D. Zusammenfassung.....	95
Literaturverzeichnis.....	96

Folgende Abkürzungen erscheinen im Text:

APS	= Adenosin-5'phosphosulfat
PAPS	= Adenosin-3'phosphat-5'phosphosulfat
ADP	= Adenosindiphosphat
ATP	= Adenosintriphosphat
G6P	= Glucose-6-phosphat
FDP	= Fructose-1.6-diphosphat
DPN	= Diphosphopyridinnucleotid
TPN	= Triphosphopyridinnucleotid
GSH und	
GSSG	= reduziertes, resp. oxydiertes Glutathion
BMP	= Mercaptopyruvat
BAL	= 2.3-Dimercaptopropanol-1
KS	= Hefekochsaft
PP	= Pyrophosphat
DPD	= Dimethyl-p-phenylendiamin

A. Einleitung und Problemstellung

=====

Woraus die Dinge entstehen, darin vergehen sie auch mit Notwendigkeit, denn sie leisten einander Busse und Vergeltung für ihr Unrecht nach der Ordnung der Zeit.

Anaximander von Milet.

Die Bauelemente der lebendigen Substanz, Kohlenstoff, Sauerstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel durchlaufen eine geschlossene Kette biologischer Oxydations- und Reduktionsprozesse, die das Kriterium des Lebens darstellt. Der grosse Cyclus ist in viele kleinere Kreisprozesse unterteilt. Aber alle werden von einem ökonomischen Prinzip beherrscht: sie arbeiten mit hoher Energieausbeute und sie regeln sich selbständig.

Durch den chemischen Mechanismus der Photosynthese wird der Kreislauf des Kohlenstoffs mit dem des Sauerstoffs und des Wasserstoffs auf das engste verknüpft. Für den Eiweisshaushalt der Natur ist der Kreislauf des Stickstoffs von besonderer Bedeutung.

Dagegen hält die Assimilation von anorganischem Schwefel einem Vergleich mit den Umsatzzahlen der Kohlenstoff- und Stickstoffassimilation nicht stand. Der Schwefelgehalt des menschlichen Körpers beträgt beispielsweise nur $1/72$ des Kohlenstoff- und $1/12$ des Stickstoffgehaltes. Während aber die letzteren eher das Gerüst bilden, nimmt der Schwefel gewisse Schlüsselstellungen im biochemischen Geschehen ein. Enzymatische Reaktionen laufen vielfach an den Sulphydryl- und Disulfidgruppen der Proteine ab. Die funktionelle Gruppe des Coenzym A ist ein Thiol und der "aktive Acetaldehyd" an den Thiazolring des Aneurins gebunden. Für die Hormonwirkung des Insulins, Ocytocins und Vasopressins ist die Disulfidgruppe des Cystins wesentlich.

Der biologische Kreislauf des Schwefels ist in der Abb.1 schematisch dargestellt. Er hat die Form einer 8 mit Sulfid im Schnittpunkt. Microorganismen und Grönpflanzen assimilieren den anorganischen Schwefel in den Reaktionen 1 - 4. Dabei wird der Schwefel unter Energieaufnahme von der +6 zur -2 wertigen Stufe reduziert und findet sich schliesslich im Cystein wieder. Der Abbau des Cysteins erfolgt im tierischen Gewebe vornehmlich auf oxydativem Wege. Als Sulfat, Sulfopyruvat und Taurin wird der Schwefel wieder ausgeschieden.

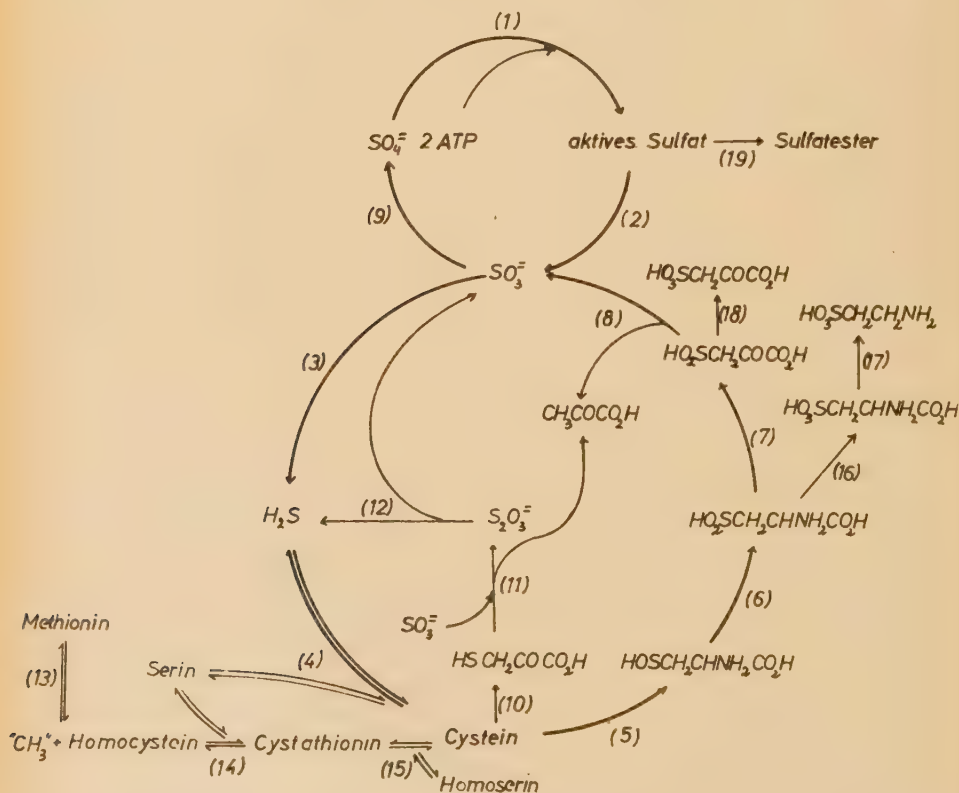


Abb. 1

Das elektrochemische Normalpotential der Reaktion



beträgt (Wiberg¹⁾) 0.90 V. Es liegt damit noch 270 mV unter dem System Pyruvat/Acetat + CO₂, welches das niedrigste biologische Redoxpotential besitzt. Eine enzymatische Reduktion, bei der Sulfat der Wasserstoff- oder Elektronenacceptor ist, kommt daher nicht in Frage. Wie aber die Pyroschwefelsäure als Säureanhydrid ein stärkeres Oxydationsmittel als Schwefelsäure ist, so besitzt auch das "aktive Sulfat", in dem Sulfat mit einem Phosphorsäurerest anhydridartig verbunden ist, ein höheres Redoxpotential.

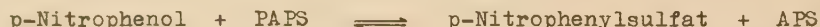
Die enzymatische Aktivierung des Sulfats wurde von Hilz und Lipmann²⁾ eingehend untersucht. Bandurski, Wilson und Squires³⁾ zeigten, dass die Aktivierung des Sulfats in zwei Stufen erfolgt. Die erste Stufe ist eine Sulfurolyse von Adenosintriphosphat unter Freisetzung von Pyrophosphat; dabei entsteht Adenosin-phosphat-sulfat (APS). Bei der zweiten Reaktion überträgt ein weiteres Molekül ATP eine Molekel Phosphorsäure auf APS.



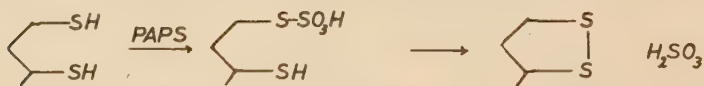
Zur gleichen Zeit schlugen Robbins und Lipmann⁴⁾ Adenosin-3'-phosphat-5'-phosphosulfat (PAPS) als Konstitutionsformel des "aktiven Sulfats" vor. Wenig später⁵⁾ berichteten sie über die Isolierung und Identifizierung des "aktiven Sulfats", und bald darauf⁶⁾ gelang ihnen die Trennung der beiden Phasen der enzymatischen Aktivierung. Einen weiteren Beweis für die Richtigkeit der Konstitutionsformel erbrachte die Synthese von APS von Baddiley⁷⁾ et al..⁵

Die Reduktion von ³⁵S-markiertem Sulfat zu Sulfit und Sulfid durch Bäckerhefeextrakte beobachteten Hilz und Kittler⁸⁾.

Das vollständige System benötigte als Cofaktoren ATP, TPN, DPN, und G-6-P. Der ATP-Bedarf weist bereits auf eine Aktivierung des Sulfats hin. Auf das Sulfat-aktivierende Enzym kann verzichtet werden, wenn PAPS auf andere Weise erzeugt wird. Dies gelingt durch ein Sulfat übertragendes Enzym aus Schafsleber, welches die Reaktion



katalysiert. Aus p-Nitrophenylsulfat wird laufend in dem Masse, wie APS frei wird, das "aktive Sulfat" regeneriert. Hilz und Kittler (loc.cit.) fanden ferner eine Hemmung des Sulfat reduzierenden Systems durch Arsenit und eine dreifache Stimulierung durch Liponsäure oder BAL. Sollte die Liponsäure unmittelbar an der Reaktion beteiligt sein, so folgt die Reduktion des "aktiven Sulfats" dem Mechanismus einer Thiolyse eines Säureanhydrids. Dabei wird intermediär ein Thiosulfatester (Bunte'sches Salz) gebildet, welcher sogleich in Umkehrung der bekannten Disulfidaufspaltung durch Sulfid reagiert:



Auch andere Autoren bestätigen den Energiebedarf der Sulfatreduktion. Wilson und Bandurski⁹⁾ fanden die optimalen Bedingungen für die Reduktion durch ein Enzympräparat aus Hefe erfüllt, wenn ATP, TPN und G-6-P zugegen waren. Dagegen konnten DPN und FDP die beiden letzteren nicht ersetzen.

Nach Ishimoto¹⁰⁾ ist auch die Sulfatreduktion durch zellfreie Extrakte von *Desulfovibrio desulfuricans* von ATP abhängig. Der Vollständigkeit halber sei noch die Beobachtung von Doman¹¹⁾ erwähnt, der die Reduktion von Sulfat in den Blättern der Grünpflanzen untersuchte. Durch Licht wurde der Einbau von markiertem Sulfat-Schwefel in das Eiweiss erheb-

lich gesteigert. Der Vorgang war unabhängig von der CO_2 -Assimilation. Man darf wohl annehmen, dass in diesem Falle die Energie für die Sulfatreduktion aus der Photophosphorylierung bezogen wurde.

Die Rolle des Sulfits als Zwischenglied der Schwefelassimilation hatten bereits Wachstumsversuche an Mangelmutanten und Isotopenkompetitionsversuche wahrscheinlich gemacht. Diese Methoden gaben die ersten Hinweise für die Vorstufen des Cystein-Schwefels. Wegen ihrer grossen Bedeutung für die Aufklärung von Stoffwechselvorgängen seien sie an Hand von Beispielen kurz erläutert.

Die Mutanten-Methode: Durch UV- oder Röntgenbestrahlung oder durch chemische Einwirkungen werden Mutanten von Schimmelpilzen und Bakterien erzeugt, die infolge Genverlustes das korrespondierende Enzym nicht mehr bilden können. Die Stoffwechselkette ist dadurch an einer oder mehreren Stellen unterbrochen und die Mutante kann sich auf dem Minimalnährboden der Wildformen nicht ausbreiten. Die als Zwischenglieder in Frage kommenden Substanzen werden an der Mutante auf ihre wachstumsfördernde Wirkung untersucht. Hockenhuß¹²⁾ untersuchte auf diese Weise die Biosynthese des Cysteins an Mutanten von *Aspergillus nidulans*. Danach scheint Thiosulfat eine Vorstufe des Cysteins zu sein. Nach seiner Hypothese wird Sulfit zu Sulfoxylat reduziert, das sich zu Thiosulfat dimerisiert. Cysteinsulfonat wird als Vorstufe des Cysteins diskutiert. Zu dem gleichen Ergebnis gelangte auch Shepherd¹³⁾. Jedoch hält dieser noch einen zweiten Weg vom Sulfit über die Cysteinsulfinsäure zum Cystein für möglich.

Auch Horowitz¹⁴⁾ fand keinen Anhaltspunkt für eine unmittelbare Verwendung von H_2S zur Cysteinsynthese. Dagegen isolierten Lampen und Mitarbeiter¹⁵⁾ Stämme des Bakteriums *E. coli*, denen Sulfat als einzige Schwefelquelle nicht genügte, die aber in Gegenwart anderer Schwefelverbindungen (Sulfit, Thiosulfat, Dithionit, Cystein, Cystathionin) darunter auch Sulfid das volle Wachstum zeigten. Englesberg¹⁶⁾ fand eine spontane Mutante von *Pasteurella pestis*,

die ebenfalls Cystein aus Schwefelwasserstoff, Thiosulfat oder Sulfit, nicht aber aus Sulfat synthetisieren konnte. Sollte die Cysteinsynthese bei Schimmelpilzen und Bakterien verschiedene Wege gehen?

Die Isotopenkompetitionsmethode brachte vornehmlich im Arbeitskreis um Cowie¹⁷⁾ aufschlussreiche Ergebnisse. So baut E.coli radioaktiven Sulfat-Schwefel nicht ein, wenn zusätzlich stabiles Sulfit, Sulfid, Cystein oder Glutathion im Überschuss angeboten werden. Man kann daraus schliessen, dass Sulfit und Schwefelwasserstoff Zwischenstufen der Sulfat-assimilation darstellen.

Einen klaren Beweis für die Biosynthese des Cysteins aus Serin und Schwefelwasserstoff brachte die Entdeckung und Isolierung des Enzyms Serinsulphydrase durch Schlossmann¹⁸⁾¹⁹⁾ und Lynen. Die enzymatische Reaktion besteht in einem Austausch der Hydroxylgruppe des Serins gegen SH. Der Bedarf an Pyridoxalphosphat reiht diese Reaktion in die Gruppe der von Metzler, Ikawa und Snell²⁰⁾ sowie von Braunstein und Schemjakin²¹⁾ untersuchten β -C-Austauschreaktionen des Serins ein. Die Serinsulphydrase wurde inzwischen in zahlreichen Microorganismen, darunter auch im Schimmelpilz Aspergillus niger nachgewiesen und von Lorch²²⁾ aus Bierhefe 1000-fach angereichert.

Über den weiteren Weg des Schwefels von Cystein zum Methionin besteht noch keine vollständige Klarheit. Für die höheren Lebewesen ist Methionin eine essentielle Aminosäure, welche mit der Nahrung aufgenommen und im Körper zu Cystein abgebaut wird. Nach Arbeiten von Stetten²³⁾ sowie DuVigneaud²⁴⁾ und Mitarbeiter erfolgt der biologische Abbau des Methionins in der Reaktionskette



Diese Stufenfolge fand Horowitz (loc.cit.) auch bei *Neurospora crassa* Mutanten. Dagegen zeigten Cowie und Bolton²⁵⁾ an einer Methionin-Mangelmutante von *E.coli*, dass Methionin nicht weiter zu anderen Schwefelverbindungen umgesetzt wird. Bei einer *E.coli* Mutanten, die neben Methionin Sulfit, Sulfid oder Thiosulfat benötigte, fanden Bolton, Cowie und Sands²⁶⁾ kein Wachstum auf Cystathionin als Schwefelquelle. Für die Irreversibilität der Methioninsynthese aus Cystein sprechen auch die Befunde von Englesberg (loc.cit.) an Mutanten von *Pasteurella pestis*. Homocystein und Cystathionin konnten zwar das Methionin, niemals jedoch Cystein ersetzen. Dass die Biosynthese des Methionins nicht in Umkehrung des Abbauweges von Stetten und DuVigneaud erfolgt, sondern wahrscheinlich einen anderen Weg einschlägt, bekräftigen die Ergebnisse von Schwartz und Shapiro²⁷⁾. An Mutanten des *Aerobakter aerogenes* konnten sie mit Hilfe von Isotopenversuchen nachweisen, dass Thiomethyladenosin wachstumswirksamer als Homocystein ist. Danach entsteht Methionin durch Übertragung der CH_3S -Gruppe auf γ -Aminobuttersäure.

Der Abbau des Cysteins im tierischen Organismus erfolgt auf zwei verschiedenen Wegen. Beim oxydativen Abbau wird Cystein über die Stufe der Cysteinsulfensäure zur Cysteinsulfinsäure oxydiert. Auf der Stufe der Cysteinsulfinsäure verlässt der Schwefel als Sulfit die Aminosäure. C.Fromageot²⁸⁾ wies in Rattenleber-Acetonpulver die "Desulfinasen" nach. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion:



Chapeville und P.Fromageot²⁹⁾ gelang es, die Desulfinase-Reaktion auch in der umgekehrten Richtung durchzuführen. Sie inkubierten Acetontrockenpulver von Kaninchenniere unter Stickstoff mit S-markiertem Sulfit, Brenztraubensäure und Glutaminsäure. Aus den Ansätzen konnten sie papierelektrophoretisch und papierchromatographisch Cysteinsulfinsäure isolie-

ren und identifizieren.

Kearney und Singer³⁰⁾ verfolgten den oxydativen Abbau der Cysteinsulfinsäure durch *Proteus vulgaris*. durch Beobachtung des O₂-Verbrauchs. Ihre Ergebnisse lassen zwei Möglichkeiten offen: 1) Oxydation zu Cysteinsäure mit nachfolgender Transaminierung zu β -Sulfonylbrenztraubensäure, oder 2) Transaminierung zu β -Sulfinylbrenztraubensäure und Spaltung in Brenztraubensäure und Sulfit mit anschliessender Oxydation.

Da Sulfit ein starkes Zellgift ist, muss die Zelle es möglichst rasch beseitigen. Dies geschieht am einfachsten durch Oxydation zu Sulfat. In einem partiell gereinigten Enzym aus Hundeleber fanden Fridowich und Handler³¹⁾³²⁾ eine Stimulierung der Sulfit-Oxydation durch Lipoat, während Cystein und Thiosulfat hemmten. Sie vermuten deshalb Liponsulfosäure als Zwischenprodukt. Diese Verbindung konnte jedoch bis heute nicht dargestellt werden. Auch die Lage des chemischen Gleichgewichtes der Disulfidaufspaltung durch Sulfit spricht gegen den vorgeschlagenen Mechanismus. Für die Sulfit-oxydation durch Leberpräparate ist Hypoxanthin ein wesentlicher Cofaktor.

Der andere Weg des Cysteinabbaus verläuft über die β -Mercaptobrenztraubensäure, die durch Transaminierung aus Cystein entsteht. Die β -Mercaptobrenztraubensäure wird enzymatisch in H₂S und Brenztraubensäure gespalten. Welche Bedeutung diesem Abbauweg zukommt, ist ungewiss. Von der β -Mercaptobrenztraubensäure führt ferner ein Weg zu Thiosulfat. In Leberpräparaten fand Sörbo³³⁾ eine β -Mercaptopyruvat-Sulfit-Transsulfurase. Thiosulfat wird von manchen Säugtieren auf dem Harnweg ausgeschieden.

Die Oxydation des Thiosulfats zu Sulfat besorgt eine Gruppe von Schwefelbakterien, deren prominente Vertreter *Thiobacillus thioparus* und *Thiobacillus thiooxidans* sind. Während *T.thioparus* Thiosulfat zu elementarem Schwefel und Sulfat im Verhältnis 2:3 abbaut, findet man bei *T.thiooxidans* nur Sulfat als Endprodukt. Dieser letztere Organismus besitzt

die einzigartige Fähigkeit, noch in 0.5 M Schwefelsäure physiologisch aktiv zu sein. Selbst durch 1.5 M H_2SO_4 werden die Zellen nicht getötet. Mit der Oxydation des Sulfits und des Thiosulfats zu Sulfat schliesst sich der biologische Kreislauf des Schwefels.

Es wurde mir die Aufgabe gestellt, die biologische Reduktion des Sulfits in Hefezellen aufzuspüren und nach Möglichkeit das betreffende Enzymsystem zu isolieren. Der Kernpunkt der Frage lautete: welche Zwischenstufen durchläuft Sulfit bei der Reduktion, und lassen sich diese isolieren. Als ein mögliches Zwischenprodukt wurde von verschiedenen Forschern¹²⁾¹³⁾³⁴⁾ Thiosulfat diskutiert. Dieses wurde daher in den Kreis des Problems einbezogen. Die Reduktion des Thiosulfats schien weniger Schwierigkeiten zu bereiten als die des Sulfits. Daher wurde sie mit der Absicht, am leichteren Fall die Methodik zu entwickeln, zuerst in Angriff genommen.

B. Hauptteil

=====

I. Die Thiosulfatdesulphydrase resp. Rhodanese der Bäckerhefe

1. Die Freisetzung von Schwefelwasserstoff aus Thiosulfat durch Hefe

- a) Historisches, Entdeckung durch Beijerinck und Buchner;
Versuche von Neuberg und Welde

Die Bildung von Schwefelwasserstoff aus Thiosulfat durch Mikroorganismen wurde erstmalig von M.W. B e i j e r i n c k³⁵⁾ um die Jahrhundertwende beobachtet. Wenig später (1903) berichteten B u c h n e r und H a h n³⁶⁾ in ihrer Monographie "Zymasegärung", dass auch zellfreie Hefepräparate Thiosulfat zu Schwefelwasserstoff umzusetzen vermögen. Die Entdeckung der enzymatischen Reduktion des Thiosulfats ist demnach so alt wie die Bezeichnung "Enzym". Eingehend beschäftigte sich jedoch erst C. N e u b e r g³⁷⁾ mit dieser Reaktion der Hefezellen. Sie schien ihm so auffällig, dass er sie in den Rahmen seiner Untersuchungen über "phytochemische Reduktionen" einbezog. In einer Arbeit zusammen mit Welde³⁷⁾ (1914) drückt er sein Erstaunen darüber aus, dass eine so ausgeprägte biochemische Reaktion über ein Jahrzehnt lang in Vergessenheit geraten konnte. Diese Forscher betonten die enge Beziehung der Thiosulfatreduktion zur Gärung, welche den für die Reduktion nötigen Wasserstoff liefern soll. Als zweites Reaktionsprodukt des Thiosulfats fanden sie Sulfit, das sie mit Nitroprussidnatrium und Zinksulfat nachweisen konnten. Für ihre Versuche verwendeten sie intakte gärende Hefezellen. An eine Isolierung der beteiligten Enzyme mit dem Ziel, einen tieferen

Einblick in den Mechanismus der Reaktion zu gewinnen, dachte man damals noch nicht.

b) Eigene Versuche an gefrieraufgeschlossenen Hefezellen und zellfreien Präparaten.

Dank den inzwischen erzielten Fortschritten der analytischen und biochemischen Methodik erschien das Vorhaben, die Versuche dort weiter zu führen, wo Neuberg und Welde sie hatten ruhen gelassen, aussichtsreich. Für meine ersten informativsten Versuche wählte ich gefrieraufgeschlossene Bäckerhefe, weil die meisten Enzyme diesen Aufschluss ohne Schaden vertragen. Das Präparat besitzt fast alle enzymatischen Eigenschaften der nativen Zellen. Dagegen ist die oft störende Permeabilitätsschranke der Zellmembran beseitigt. Beim Auswaschen mit Pufferlösungen oder destilliertem Wasser geben solche Präparate nur einen verschwindenden Bruchteil ihres Proteins ab, während sich die niedermolekularen Inhaltsstoffe, darunter auch die Coenzyme weitgehend abtrennen lassen.

Für die Inkubation der Hefepreparate wurde eine möglichst einfache Apparatur angestrebt (Abb.2). Sie besteht aus einem

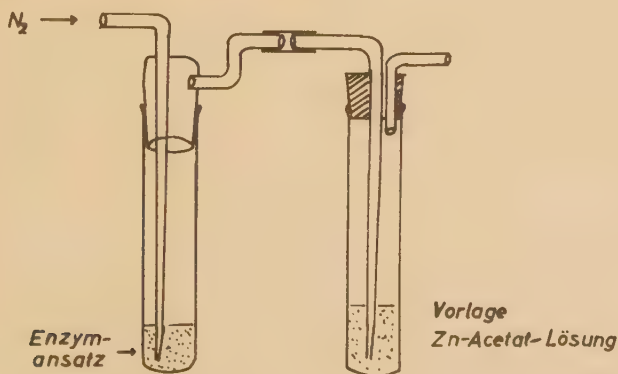


Abb.2

dickwandigen Reagenzglas mit Schliffaufsatz zum Durchleiten von Stickstoff. Um eine Oxydation des entstehenden Schwefelwasserstoffs nach Möglichkeit zu vermeiden, wurde der Stickstoff durch Passage eines Kupferturmes von Sauerstoffresten befreit. Der Schwefelwasserstoff wird während der Inkubation im Stickstoffstrom in eine Vorlage mit Zinkacetat getrieben und dort aufgefangen. Inkubationsgefäß und Vorlage sind so dimensioniert, dass leicht 6-8 Inkubationen nebeneinander im Thermostat durchgeführt werden können. Nach erfolgter Inkubation wird in der Vorlage Schwefelwasserstoff mit Dimethyl-p-phenylendiamin zu Methylenblau umgesetzt (näheres im experimentellen Teil) und kolorimetrisch bestimmt.

In der Tabelle 1 werden die Fähigkeiten zweier gefrier-aufgeschlossener Hefepräparate bezüglich der H_2S -Bildung aus Thiosulfat verglichen. Während das eine Präparat über sämtliche Inhaltsstoffe der natürlichen Zellen verfügt, wurde das andere durch viermaliges Auswaschen mit destilliertem Wasser

Tabelle 1

Nr.	Enzympräp.	μM G6P	γ TPN	μM $S_2O_3^{=}$	μM H_2S gef.
1	0.2 ml nicht ausgewaschen	10	100	5	0.13
2	0.20 ausgewaschen	10	100	5	0.05
3	0.20 ausgewaschen	0	0	5	0
4	0.20 nicht ausgewaschen	10	100	0	0

Inkubation: Das Volumen der Ansätze wurde mit m/15 Phosphat-Puffer auf 2.00 ml ergänzt. Es wurde 65 Min bei $35^\circ C$ unter Durchleiten eines O-freien Stickstoffstromes inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen durch 10 Min. langes Erhitzen der Ansätze in einem Wasserbad von $100^\circ C$ denaturiert. Sodann wurden noch weitere 20 Min. N_2 durchgeleitet.

an Substraten und Cofaktoren verarmt. Wie der Versuch zeigt, ist die Bäckerhefe befähigt, Schwefelwasserstoff aus Thiosulfat freizusetzen. Der entstandene Schwefelwasserstoff lässt sich mit der Methylenblau-Methode erfassen. Ein Vergleich zwischen den Versuchen 2 und 3 weist auf die Rolle des Zwischenferment-systems bei der Reduktion des Thiosulfats hin. Die ausgewaschenen Hefezellen besitzen jedoch nur noch 38% der Aktivität der unverarmten. Dieser Umstand lässt bereits die Vermutung zu, dass neben dem Warburg-Christian-System noch ein zusätzlicher Co-faktor für die Reduktion des Thiosulfats erforderlich ist.

Auch zellfreie Extrakte aus Bäckerhefe können in Gegenwart von TPN und Glucose-6-phosphat Thiosulfat zu Schwefelwasserstoff reduzieren. Diese wurden entweder durch hochtouriges Schütteln einer Hefesuspension mit Glasperlen in der von Merckenschlager, Schlossmann und Kurz entworfenen Schüttelmaschine, oder durch Extraktion von getrockneter Bäckerhefe mit M/15 sec. Natriumphosphat (Macerationssaft nach Lebedew⁴²⁾) gewonnen. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Versuche mit rohen, zellfreien Extrakten.

Tabelle 2

Nr.	Enzympräparat	$\mu\text{M G6P}$	γ TPN	$\mu\text{M S}_2\text{O}_3^{=}$	Min.	$\mu\text{M H}_2\text{S}$ gef.
1	0.2 ml Extrakt	10	100	5	75	0.055
2	von zerschlag.	10	100	0	75	0
3	Hefe	10	100	5	65	0.080
4	Kontrolle	10	100	5	65	0
5	0.20 ml	10	100	5	60	0.110
6	Macerations-	10	100	0	60	0
7	saft nach	0	100	5	60	0.062
8	Lebedew	10	0	5	60	0.070

Versuche 1 u. 2 Endvolumen 2.0 ml mit Phosphatpuffer pH 8.25. Versuche 3-8 Endvol. 2.0 ml mit Phosphatpuffer pH 7.0. Kontrollversuch Nr.4: Enzym vor Inkubation durch Kochen zerstört. Inkubation unter Durchleiten eines N_2 -Stromes. Stop durch 10 Min. Erhitzen auf 100°C .

Mit dem Macerationssaft (der Versuche 6 - 9 in Tab.2) wurde ausserdem eine Enzym- und eine Zeitabhängigkeit der Bildung von Schwefelwasserstoff aus Thiosulfat aufgenommen (Abb.3 und 4).

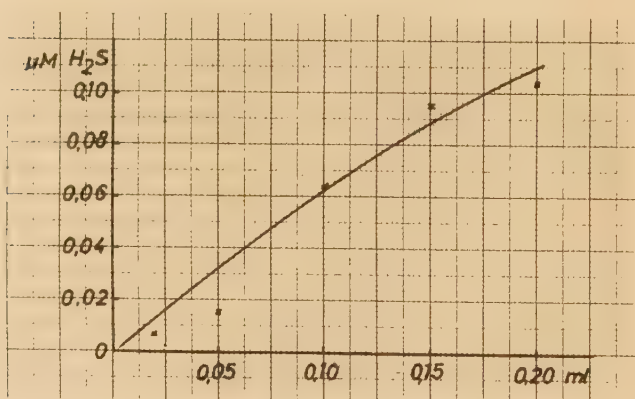


Abb.3

Enzymabhängigkeit.

Jeder Ansatz enthält 200 μM G6P; 100 μM TPN; 5 μM $S_2O_3^{2-}$; M/15 Phosphat pH 7.0; 0.02-0.20 ml Hefe-Macerationssaft Endvol. 2.0 ml. 60 Min. bei 35°C inkubiert. Stop durch Erhitzen.

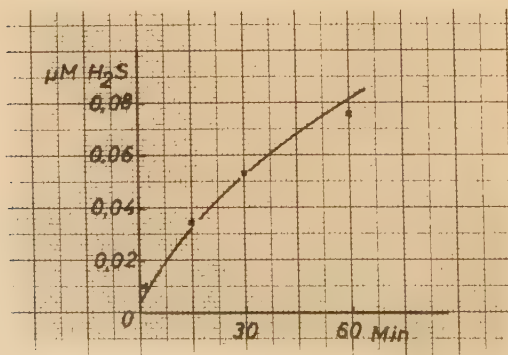


Abb.4

Zeitabhängigkeit der H_2S -Bildung durch Macerationssaft. Jeder Ansatz enthält 0.10 ml Macerationssaft; 100 μM TPN; 200 μM G6P; 5 μM $S_2O_3^{2-}$; M/15 Phosphat pH 7.0. Stop durch Erhitzen.

Die beiden Kurven rechtfertigen die Annahme einer enzymatischen Reaktion. Wurden die Extrakte vor der Inkubation eine kurze Zeit auf 100°C erhitzt, so entstand kein Schwefelwasserstoff (Versuch Nr.4, Tab.2).

Die nächsten Versuche zielten darauf ab, aus dem Hefemacerationssaft durch Fraktionierung mit Aceton Enzympräparate zu gewinnen, welche einzeln oder in Kombination aktiv waren. Eine Aufteilung in drei Fraktionen, nämlich 28, 44 und 54 Vol% Aceton, ergab überraschend eine Überlegenheit der 2. und 3. Fraktion in Kombination gegenüber den einzelnen Fraktionen. Als Beispiel für eine solche Acetonfällung sei Tabelle 3 angeführt.

Tabelle 3

Nr.	ml Fraktion I	ml Fraktion II	ml Fraktion III	µM H ₂ S gef.
1	0.02	-	-	0.002
2	-	0.02	-	0.034
3	-	-	0.02	0.024
4	-	0.02	0.02	0.110

Die Ansätze enthielten 20 µM G6P; 50 µM TPN; 5 µM S₂O₃⁼; Zwischenferment; M/15 Phosphat pH 7.0; Endvol. 2.0 ml; 30 Min bei 35°C im N₂-Strom inkubiert; Stop durch Erhitzen.

Da den Inkubationen zusätzlich gereinigtes Zwischenferment beigelegt war, liessen die Versuche nur den Schluss zu, dass abgesehen von der Bereitstellung des TPNH zwei Enzyme an der Reduktion des Thiosulfats beteiligt sind.

Oft wurde jedoch nach der Fraktionierung mit Aceton nur noch eine verschwindend geringe Aktivität gefunden. Auch die anfangs aktiven Präparate verloren innerhalb von Stunden die Fähigkeit, aus Thiosulfat Schwefelwasserstoff freizusetzen. Welche Fraktion instabil war, wurde nicht untersucht. Denn diese Frage klärte sich alsbald nach Auffinden des biologischen Wasserstoffüberträgers der Reaktion von selbst.

2. Glutathion und Cystein, die Wasserstoffdonatoren der Thiosulfatdesulphydrase

Einen ersten Hinweis für die Beteiligung eines Cofaktors gab eine Inkubation der Acetonfraktion III unter Zusatz von Hefekochsaft. Dabei ergab sich ein fast lineares Ansteigen der H_2S -Produktion mit zunehmender Menge Kochsaft (Abb.5), ohne eine Sättigung zu erreichen. Die zur Kontrolle aufge-

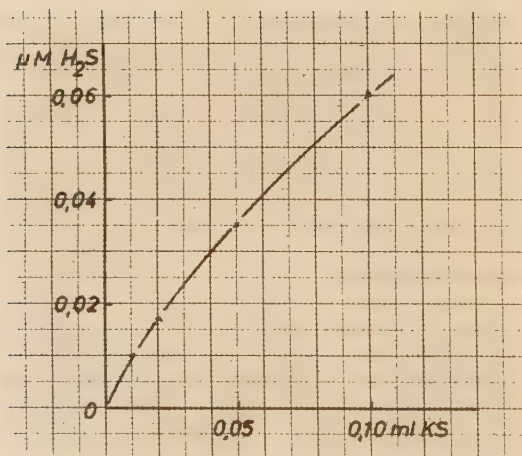


Abb.5

Kochsaftabhängigkeit der Acetonfraktion III.
Die Ansätze enthielten 0.02 ml Acetonfraktion III;
20 μM G6P; 5 μM $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$; 100 γ TPN; Zwischenferment. 30 Min
bei 36°C unter N_2 -Durchfluss inkubiert. Stop durch Erhitzen.

nommene Enzymabhängigkeit (Abb.6) zeigt, dass der Hefekochsaft nur im Zusammenspiel mit der aktiven Proteinfraction wirksam ist.

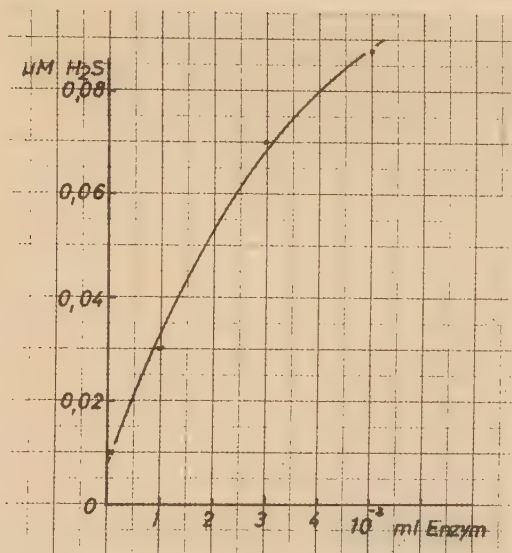


Abb.6

Enzymabhängigkeit unter Zusatz von Kochsaft.
Die Ansätze enthielten 20 µM G6P; 5 µM $S_2O_3^{2-}$;
100 µTPN; 0.10 ml Hefekochsaft; Zwischenferment;
M/15 Phosphatpuffer pH 7.0.
30 Min bei 36°C unter N_2 -Durchfluss inkubiert.
Stop durch Erhitzen.

Um etwas über die Natur des die Reaktion stimulierenden Faktors zu erfahren, schienen Versuche mit gefrieraufgeschlossenen und ausgewaschenen Hefezellen geeignet. Diese sind in der Tabelle 4 zusammengefasst. Ein Vergleich zwischen Ver-

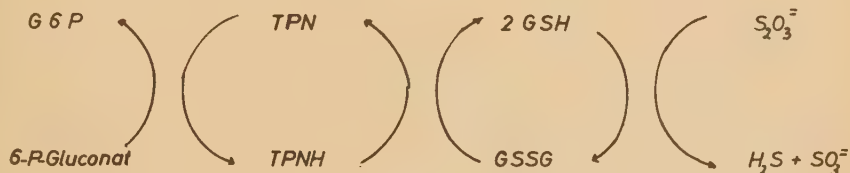
Tabelle 4

Nr.	uM G6P	γ -TPN	uM $S_2O_3^{=}$	Zusatz	uM H_2S gef.	Bemerkung
1	10	100	5	0.20 ml KS	0	Vor Inkubation durch Erhitzen denat.
2	10	100	5	0.20 ml KS	0.104	
3	10	100	5	-	0	
4	10	100	-	0.50 ml KS	0.020	
5	10	100	5	0.50 ml KS	0.182	
6	10	100	5	0.50 ml KS verascht	0.006	
7	10	100	5	0.50 ml KS-Norit-Überst.	0.148	
8	10	100	5	5 uM Cystein	0.192	
9	10	100	-	5 uM Cystein	0.012	
10	-	-	5	5 uM Cystein	0.144	
11	-	-	5	5 uM GSH	0.150	

Jeder Ansatz enthielt 0.10 ml Suspension gefrieraufgeschlossener und ausgewaschener Bäckerhefe; M/15 Phosphat pH 7.0; Endvol. 2.0 ml. 30 Min. bei 37°C unter N_2 -Durchfluss inkubiert. Stop durch Erhitzen.

suchen 4 und 5 zeugt nocheinmal für die Stimulierung durch den Hefekochsaft. Mit konz. Schwefelsäure und Wasserstoffperoxyd veraschter Kochsaft ist dagegen unwirksam (Versuch 6). Dieser Versuch schliesst die Aktivierung durch ein Metall-Ion aus. Sollte der Cofaktor ein Nucleotid sein, dann müsste er von aktiver Kohle adsorbiert werden. Eine Behandlung des Hefekochsaftes mit Norit reduzierte zwar den Gehalt an Nucleotiden auf rund 6% des ursprünglichen Wertes (gemessen an der Absorption

bei 260 mu), der Kochsaft behielt jedoch 80% seiner Aktivität (Versuch 7). Schliesslich zeigen die Versuche 10 und 11, dass Cystein und Glutathion den Kochsaft ersetzen können. Fügt man den Inkubationen die nötige Menge dieser SH-Verbindungen bei, so bedarf es sogar keines reduzierenden Hilfsystems mehr. Glucose-6-phosphat und TPN werden überflüssig. Glutathion und Cystein sind demnach die unmittelbaren Wasserstoffdonatoren für die biologische Reduktion des Thiosulfats durch Hefe. Die enge Beziehung dieser Reaktion zur Gärung, die Neuberg und Welde (loc.cit.) bereits fanden, erkennt man unschwer aus dem untenstehenden Formelschema.



Bei Gegenwart bloss katalytischer Mengen von reduziertem Glutathion kann dieses über das Warburg-Christian-System im Verein mit der TPNH-Glutathionreduktase der Hefe laufend regeneriert werden, so dass letztendlich die Oxydation des Glucose-6-Phosphats der Motor der Thiosulfatreduktion ist.

Im Lichte dieser Tatsache lassen sich auch Ergebnis und Misserfolg der Acetonfraktionierung zwanglos erklären: Die Acetonfraktion II enthielt wahrscheinlich die im rohen Zustand sehr instabile Glutathionreduktase.

3. Die nichtenzymatische Reaktion zwischen Thiosulfat und Cystein unter Bildung von Schwefelwasserstoff

Nachdem die SH-Verbindung Cystein und Glutathion als Substrate der Thiosulfatdesulphydrase erkannt waren, schien der Weg für die weitere Anreicherung des Enzyms unter Verwendung des Methylenblau-Tests geeignet. Es trat jedoch eine unerwartete Komplikation auf.

Thiosulfat reagiert unter den Versuchsbedingungen mit Cystein oder Glutathion in einer nichtenzymatischen Reaktion, wobei Schwefelwasserstoff entsteht. Steigmann³⁸⁾ wies als erster auf diese Reaktion hin. Den Umfang der nichtenzymatischen Bildung von Schwefelwasserstoff erkennt man am besten aus den Kurven der Abb.7, in denen gefundenes H_2S gegen steigende Konzentration an Thiosulfat und Cystein, wobei jeweils die Konzentration des einen konstant blieb, aufgetragen wurde.

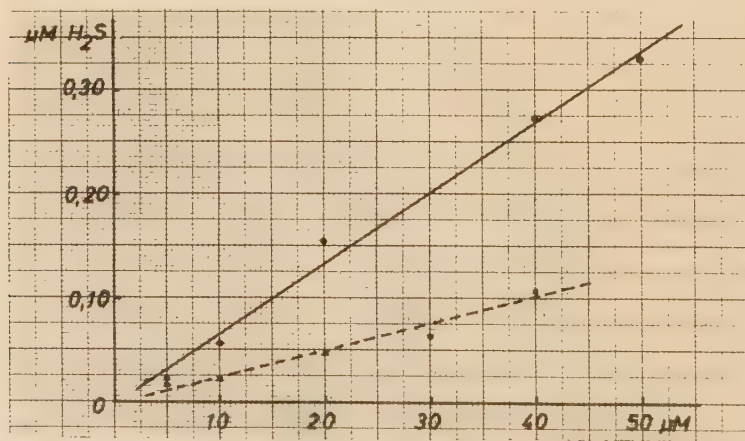


Abb.7

Kurve 1: 50 μM $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$; 5-50 μM Cystein; M/10 Phosphat pH 7.0; Endvol. 2.0 ml. 1 Stunde bei 37°C unter N_2 -Strom inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit Verbindung zur Zn-Acetat-Vorlage unterbrochen.

Kurve 2: 20 μM Cystein; 5-40 μM $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$; cet.par.

-----A

Die Kurven verlaufen in dem Bereich zwischen 0 und 20 $\mu\text{M}/\text{ml}$ der eingesetzten Reagenzien linear. Jedoch verläuft die Cysteinabhängigkeit wesentlich steiler. Die Cysteinkonzentration beeinflusst die Bildung von Schwefelwasserstoff etwa drei mal so stark wie die Thiosulfatkonzentration.

Diese Reaktion zwischen Thiosulfat und Cystein wurde unlängst von Szczepkowski³⁹⁾ untersucht. Experimente mit ^{35}S -markiertem Thiosulfat ergaben, dass nur das äussere Schwefelatom als H_2S entweicht. Ein zweistufiger Reaktionsmechanismus wurde vorgeschlagen:



Cysteinsulfosäure konnte im Papierchromatogramm durch Vergleich mit einem authentischen Präparat nachgewiesen werden. Das Auffinden von Cysteinsulfosäure ist jedoch kein Beweis für den vorgeschlagenen Mechanismus. Szczepkowskis Inkubationen enthielten 1 mM Thiosulfat und 1 mM Cystein in 5 ml. Das ist die zehnfache Konzentration der Maximalwerte in den Kurven der Abb.6. In Anbetracht der langen Inkubationsdauer (über Nacht) und des doppelten Überschusses an Thiosulfat ist anzunehmen, dass im Zeitpunkt der Aufarbeitung des Ansatzes die Reaktion beendet und alles Cystein oxydiert war. Im übrigen reagiert Cysteinsulfosäure in neutraler Lösung augenblicklich mit Cystein, wobei sich das Gleichgewicht (Reaktion (2)) der Disulfidaufspaltung durch Sulfit einstellt. Nach neueren Arbeiten von Stricks und Kolthoff⁴⁰⁾ sowie Cecil und McPhee⁴¹⁾ liegt dieses Gleichgewicht jedoch ganz auf der Seite des Disulfids. Die Cysteinsulfosäure, welche Szczepkowski fand, entstammt daher unmöglich der hypothetischen Reaktion (1), sondern aus dem Gleichgewicht der Reaktion (2).

Es sollte hier jedoch nicht untersucht werden, welcher Reaktionsmechanismus den Kurven der Abb.7 zugrunde liegt. Der Versuch diente lediglich dem Zweck, die Cystein und Thiosulfat-

konzentrationen so zu wählen, dass die nichtenzymatische Bildung von Schwefelwasserstoff im Vergleich zur enzymatischen möglichst gering und damit zu vernachlässigen war.

4. Wahl des Hefeaufschlusses und Gewinnung eines enzymatisch aktiven Trockenpulverpräparates

Bevor jedoch eine Anreicherung des Enzyms in Angriff genommen wurde, sollten einige Versuche Auskunft über Stabilität und Löslichkeitseigenschaften des Enzyms geben. Diese führten zu überraschenden Ergebnissen und offenbarten einige ungewöhnliche Eigenschaften der Thiosulfatdesulphydrase.

Der Macerationssaft nach Lebedew⁴²⁾ ist relativ hitzebeständig. Einstündiges Erhitzen auf 100°C im Wasserbad zerstört nur etwa die Hälfte der Aktivität.

Der rohe Extrakt ist ferner unempfindlich gegen Säuren. M/100 Salzsäure vermag über kurze Zeit die Aktivität nicht zu zerstören. In einem angereicherten Präparat (Trockenpulver s.w.u.) konnte sogar die Aktivität mit Trichloressigsäure gefällt und aus dem Niederschlag mit M/15 Phosphatpuffer pH 7.0 wieder in Lösung gebracht werden. Dagegen ging durch kurzes Einwirken von M/100 NaOH die gesamte Aktivität verloren.

Da man nur sehr wenige Enzyme kennt, die eine derartig robuste Hitze- und Säurebehandlung ohne Schaden vertragen, führten diese Versuche zu Zweifeln an der Proteinnatur des Katalysators. Bei diesen Prozeduren ging jedoch stets ein grosser Teil der Aktivität in den Niederschlag, während der Rest im Überstand verblieb, so dass Hitzeschritt und Säurefällung keine wesentliche Verbesserung der spezifischen Aktivität brachten.

Aussichtsreicher schien dagegen die Acetonfraktionierung des Macerationssaftes zu sein. Die Aktivität fällt jedoch erst bei relativ hohen Acetonkonzentrationen zwischen 40 und 69 Vol% Aceton. Trotzdem konnte durch Fraktionierung zwischen

48 und 69 Vol% Aceton in 61%iger Ausbeute eine 15 fache Anreicherung erzielt werden. Das Präparat wurde im Vakuum überkonz. Schwefelsäure getrocknet und konnte bei -15°C ohne Verlust aufbewahrt werden. Eine Ammoniumsulfatfällung im Anschluss an die Acetonfraktionierung ergab, dass das Enzym erst zwischen 60 und 80 prozentiger Sättigung der Lösung ausfällt.

Da das Enzym bezüglich Stabilität und Löslichkeit derartig extreme Eigenschaften aufwies, die sich allenfalls noch mit denen des Cytochroms c vergleichen lassen, schien es angebracht, einen spezifischeren Aufschluss der Hefe zu suchen, als die Maceration nach Lebedew⁴²⁾ darstellt.

Für die Isolierung und Kristallisation des Cytochroms c aus Bäckerhefe schloss Okunuki⁴³⁾ die Zellen mit Essigester auf: Frische Bäckerhefe wird bei Zimmertemperatur mit 0.14 Teilen Essigester verrührt. Die Hefe verflüssigt sich dabei nach kurzer Zeit und eine intensive Gärung setzt ein. Nach einer Stunde werden die aufgeschlossenen Zellen zweimal gründlich mit Wasser gewaschen und schliesslich 15 Stunden mit 10 prozentiger Ammoniumsulfat-Lösung extrahiert. Dieser Extrakt stellt das Ausgangsmaterial zur Gewinnung von Cytochrom c über eine Kationenaustauschersäule dar. Er enthält aber auch Thiosulfatdesulphydrase in hoher Aktivität. Das Präparat besitzt einen rund doppelten Reinheitsgrad verglichen mit dem Acetonpulver. Ammonsulfat wird durch Dialyse entfernt. Aufkonzentrieren des Enzyms aus der sehr verdünnten Proteinlösung (0.5 mg/ml Protein) erreicht man durch Lyophilisation. Man erhält ein schwach rosa gefärbtes Trockenpulver, das, bei -15°C aufbewahrt, die Thiosulfatdesulphydraseaktivität ohne Verlust behält.

In Abb.8 (siehe nächste Seite) ist eine Enzymabhängigkeit mit dialysiertem Ammonsulfatextrakt wiedergegeben. Mit dem Lyophilisat stand nunmehr ein ausreichend reines Präparat in beliebiger Menge zur Verfügung, um in weiteren Versuchen die Frage nach der Stöchiometrie der Reaktion abzuklären.

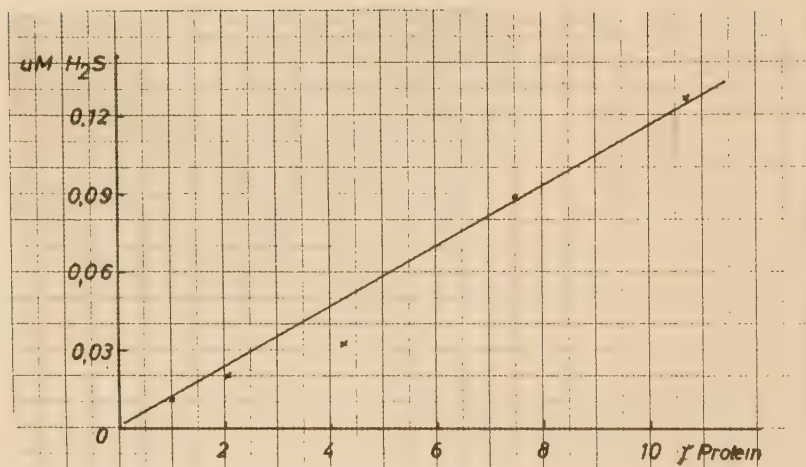


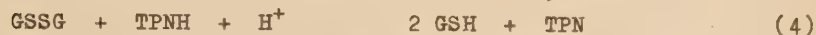
Abb.8

Enzymabhängigkeit der Thiosulfatdesulphydrase im dialysierten Ammoniumsulfat-Extrakt. Inkubation mit 50 μM $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$; 10 μM GSH; 20 μM Trilon B; $\text{M}/15$ Phosphat pH 7.0, Endvol. 2.35 ml. 30 Min bei 37°C unter N_2 -Strom inkubiert. Stop durch Abtrennen der Vorlage.

5. Optischer Test der Thiosulfatdesulphydrase durch Koppelung mit dem TPNH-Glutathionreduktase System

Die Prüfung der enzymatischen Reaktion stützte sich bislang auf den Nachweis von Schwefelwasserstoff, der das einzige quantitativ erfasste Produkt der Reaktion zwischen Glutathion oder Cystein und Thiosulfat darstellte. Das Schicksal der SH-Verbindung konnte jedoch nur die Oxydation zum Disulfid sein. Oxydiertes Glutathion lässt sich aber mit Hilfe der TPNH-Glutathionreduktase nachweisen, indem man die Abnahme der charakteristischen Bande des reduzierten Pyridinnucleotids misst. Demnach sollte man auch die enzymatische Oxydation des Glutathions durch Thiosulfat optisch verfolgen können,

sofern TPNH und Glutathionreduktase im Überschuss vorliegen.



Man entnimmt aus den Gleichungen, dass durch die Koppelung der beiden Reaktionen (3) und (4) für ein Mol reduziertes Thio-sulfat oder entstandenes H_2S ein Mol TPNH verbraucht wird.

Die in den vorhergehenden enzymatischen Versuchen gefundenen Mengen Schwefelwasserstoff liegen in einer Größenordnung, für die sich auch im optischen Test mit TPNH-Glutathion-reduktase als Hilfsystem ein messbarer Lauf voraussagen lässt. Ein Versuch mit gereinigter Hefe-Glutathionreduktase und en-zymatisch reduziertem TPNH entsprach den Erwartungen (Abb.9).

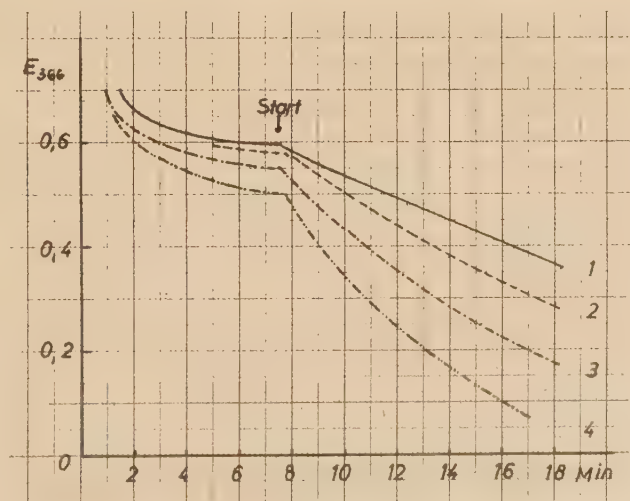


Abb.9

Kinetik der Thiosulfatdesulphydrase im optischen Test
 0.10 ml 1%ige Albuminlösung; 5 μM K-Trilonat; 0.19 μM TPNH;
 2.5 μM GSH; 25 μM $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$; GSSG-Reduktase; M/10 Phosphatpuffer
 pH 7.6; Endvol. 1.02 ml. Start mit 0.01-0.06 ml Trocken-
 pulverlösung (10 mg/ml). Schichtdicke 10 mm; Temp. 23,5°C.
 Kurve 1: 0.01 ml, 2: 0.02 ml, 3: 0.04 ml, 4: 0.06 ml
 Enzymlösung.

Der Gebrauch dieses einfachen optischen Testes zur Messung der Aktivität der Thiosulfatdesulphydrase setzt aber noch eine Überlegung voraus: Wie man aus den Kurven ersieht, findet man vor dem Start mit Thiosulfatdesulphydrase einen beträchtlichen Leerlauf. Dieser setzt sich zusammen aus der Autoxydation des Glutathions, welche durch Spuren von Schwermetallen katalysiert wird, und der in Abschnitt 3) beschriebenen nichtenzymatischen Reaktion. Durch Zusatz von Komplexbildnern z.B. Versene kann man die Autoxydation weitgehend unterdrücken. Gravierender stört die nichtenzymatische Oxydation des Glutathions durch Thiosulfat. Eine Verunreinigung der Glutathionreduktase mit Thiosulfatdesulphydrase ist ausgeschlossen, da der Leerlauf unabhängig von der eingesetzten Menge an Glutathionreduktase ist. Will man daher im optischen Test die Thiosulfatdesulphydraseaktivität eines Präparates ermitteln, so ist der Leerlauf durch eine Korrektur zu berücksichtigen.

Eine weitere Schwierigkeit stellt das schnelle Abklingen der Reaktion dar. Die Geschwindigkeit bleibt um so weniger konstant, je mehr Enzymaktivität im Test eingesetzt wird. Die Initialgeschwindigkeit der Reaktion - und nur diese ist nach der Theorie der eingesetzten Aktivität proportional - lässt sich bei höheren Enzymkonzentrationen nur noch schwer und ungenau interpolieren. Der Grund für das schnelle Abklingen der Reaktion dürfte in einer Vergiftung des Enzyms durch die Reaktionsprodukte Sulfit oder Schwefelwasserstoff zu suchen sein.

Berücksichtigt man diese Komplikationen, so erhält man trotzdem noch eine befriedigende Enzymabhängigkeit (Abb.10). Wie man sieht, ist der optische Test hinreichend genau, um als Kriterium für eine weitere Anreicherung des Enzyms zu dienen. Gegenüber der H_2S -Bestimmung mit der Methylenblau-Methode besitzt der optische Test den Vorzug des geringeren apparativen und zeitlichen Aufwandes, er ist jedoch weniger empfindlich.

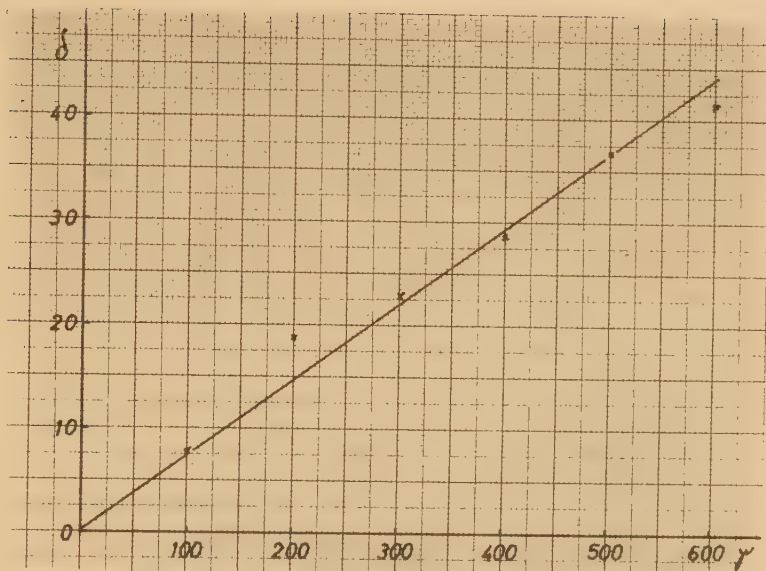


Abb.10

Enzymabhängigkeit der Thiosulfatdesulphydrase im optischen Test. Versuchsbedingungen s. Legende zu Abb.8
Abzisse: Trockenpulver; Ordinate: $\delta \cdot 10^{-3}$ = Änderung der optischen Dichte bei 366 m μ unter Berücksichtigung des Leerwertes ohne Enzym.

6. Stöchiometrie der Reaktion

Die Methodik des H₂S-Testes gestattet es, die enzymatische Reaktion mit Natronlauge abzustoppen, den restlichen Schwefelwasserstoff mit CO₂ in die Zinkacetat-Vorlage überzutreiben und im Enzymanatz GSSG mittels der Glutathion-reduktase zu bestimmen. Dadurch besteht die Möglichkeit, H₂S und Glutathion oxyd. aus demselben Ansatz miteinander

zu vergleichen und zu einer ersten Aussage bezüglich der Stöchiometrie der Reaktion zu kommen. Auf diese Weise wurde die Enzymabhängigkeit der Bildung von H_2S und GSSG nebeneinander aufgenommen. Die gefundenen Werte für GSSG und H_2S (Abb.11) liegen auf einer Linie, ein Beweis dafür, dass oxydiertes Glutathion und Schwefelwasserstoff im molaren Verhältnis 1:1 entstehen.

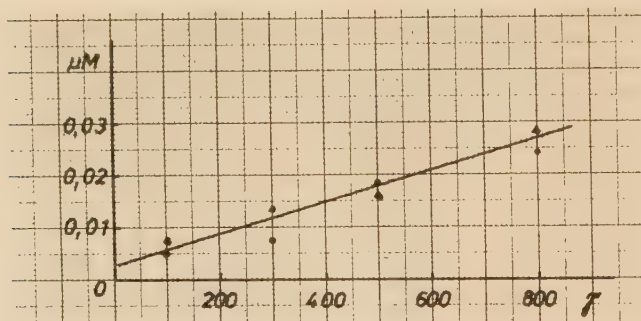
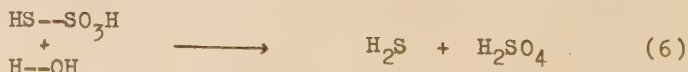


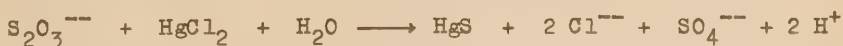
Abb.11

Bestimmung von H_2S und GSSG nebeneinander.
 Abzisse: Trockenpulver; Ordinate: μM H_2S bzw. GSSG gefunden. Die Ansätze enthielten: $50 \mu\text{M}$ $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$; $10 \mu\text{M}$ K-Trilonat; Phosphat pH 7.6; Endvol. 2.0 ml . Vor dem Start mit $0.01 - 0.08 \text{ ml}$ Enzymlösung (10 mg/ml Tr.p.) wurde 20 Min N_2 durch die Ansätze geleitet, dann 30 Min bei 25°C unter N_2 -Strom inkubiert. Stop mit 0.05 ml 2 n NaOH , nach 5 Min wurde 20 Min CO_2 durchgeleitet. In der Vorlage H_2S bestimmt. In einem aliquoten Teil des Ansatzes wurde GSSG mit TPNH-Glutathionreduktase bestimmt. Δ GSSG; $\bullet$ H_2S .

Rein formal sind zwei Möglichkeiten der Aufspaltung von Thiosulfat denkbar:



Die erste Gleichung (6) entspricht einer Umkehrung der Bildungsweise von Thioschwefelsäure aus Schwefelwasserstoff und Schwefeltrioxyd nach M.Schmidt⁴⁴). Die zweite Gleichung (7) ist die Umkehrung der gebräuchlichen Darstellungsmethode für Thiosulfat aus Sulfit und Schwefel. Nachdem bei der enzymatischen Aufspaltung des Thiosulfats oxydiertes Glutathion und Schwefelwasserstoff im gleichen molaren Verhältnis entstanden, konnte nur Sulfit das zweite Spaltprodukt des Thiosulfats sein. Glutathionsulfonsäure kann aus Gründen, die bereits in Abschnitt 3) dieses Kapitels dargelegt wurden, nicht entstehen. Tatsächlich konnten Neuberg und Welde (loc.cit.) Sulfit über den Nitroprussidnatrium-Zink-Komplex bereits qualitativ nachweisen. Eine quantitative Beziehung zwischen Sulfit und Schwefelwasserstoff stand noch aus. Zu diesem Zweck musste aber erst eine Methode der Sulfitbestimmung gefunden werden, die in Gegenwart einer etwa 500fachen Menge von Thiosulfat noch funktioniert. Als geeignet erwies sich das Verfahren von Grant⁴⁵), das auf der Freisetzung von Fuchsin aus seinem farblosen Formaldehydaddukt durch Sulfit beruht. Thiosulfat wird vor der Bestimmung durch Reaktion mit Quecksilberchlorid beseitigt:



Quecksilbersulfid wird abzentrifugiert. Die Gegenwart von Thiosulfat setzt zwar die Empfindlichkeit der Sulfitbestimmung erheblich herab, aber die Eichkurve, die den Bedingungen der Inkubation mit 50 µM Thiosulfat und 5 µM Cystein pro Ansatz entsprach, verlief zwischen 0 und 0.25 µM Sulfit linear.

Das Verhältnis $\text{SO}_3^{--}/\text{H}_2\text{S}$ wurde bei Einsatz verschiedener Enzymmengen bestimmt. Der parallele Verlauf der Kurven (Abb.12) (siehe nächste Seite) beweist, dass bei der enzymatischen Reduktion des Thiosulfats Sulfit und Schwefelwasserstoff im molaren Verhältnis 1 entstehen. Aus dem Verhältnis $\text{GSSG}/\text{H}_2\text{S}$ einerseits und dem Verhältnis $\text{SO}_3^{--}/\text{H}_2\text{S}$ andererseits folgt zwangsläufig das Verhältnis $\text{GSSG}/\text{SO}_3^{--}$, so dass die Reaktionsgleichung (3)

auf Seite 25 als gesichert gelten kann.

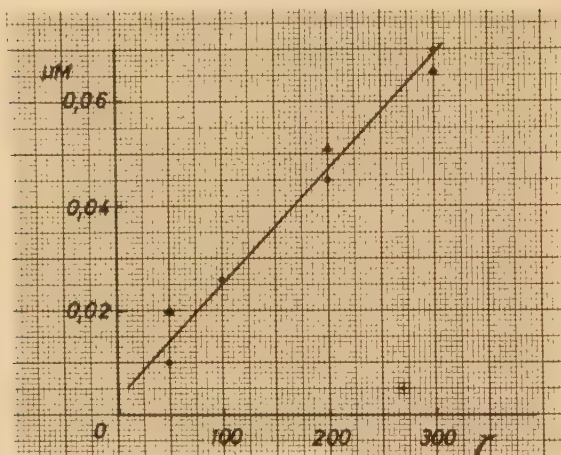


Abb.12

Bestimmung von H_2S und Sulfit in einem Ansatz.
Abzisse: Trockenpulver; Ordinate: $\bullet$ μM H_2S , Δ μM Sulfit
gefunden. Inkubation s. Legende zu Abb.11. Sulfit-
bestimmung s. im experimentellen Teil.

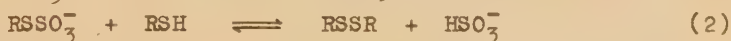
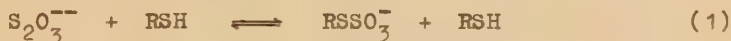
Die Absolutwerte der Kurven in den Abb.11 und Abb.12 sind von untergeordneter Bedeutung. Die Ursache dafür, dass die Kurvenwerte sich nicht genau decken, ist abgesehen von den experimentellen Schwierigkeiten in methodischen Fehlern zu suchen. Der Beweis für die äquimolare Bildung von Schwefelwasserstoff, Sulfit und oxydiertem Glutathion stützt sich auf die Parallelität der gefundenen Werte.

7. Cysteinsulfosäure - kein Zwischenprodukt der enzymatischen Reaktion

Nachdem die Stöchiometrie der thiosulfatdesulhydrase-katalysierten Reaktion



keine Zweifel mehr zuliess, wurde die Frage nach dem Mechanismus der Reaktion akut. Als ein mögliches Zwischenprodukt schien das Bunte'sche Salz RSSO_3H zumindest einer Prüfung würdig. Diese Hypothese setzt einen zweistufigen Reaktionsmechanismus voraus, den Szczepkowski (loc.cit.) für die nichtenzymatische Reaktion zwischen Cystein und Thiosulfat annimmt:



Zwar konnte bei der Auftrennung der Versuchsansätze mit der Papier-Hochspannungselektrophorese niemals auch nur eine Spur von Cysteinsulfosäure gefunden werden, aber solange die Ansätze noch Cystein enthalten, kann man diese auch nicht erwarten (vergl. Abschnitt 3). Sollte dennoch das Bunte'sche Salz bei der enzymatischen Reaktion intermediär auftreten, dann müsste die Thiosulfatdesulhydrase die Reaktion (1) auch im rückläufigen Sinne katalysieren, und man müsste bei der Inkubation des Enzyms mit Cysteinsulfosäure und Schwefelwasserstoff Thiosulfat finden.

Cysteinsulfosäure und Schwefelwasserstoff reagieren aber in neutraler Lösung und bei Zimmertemperatur bereits spontan miteinander und bilden Thiosulfat. Als Umkehrung der Gleichung (1) stützt diese Reaktion den von Szczepkowski vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus. Die Reaktion wurde inzwischen von Sörbo⁴⁶⁾ eingehend untersucht.

Vergleicht man jedoch die Geschwindigkeit der Thiosulfatbildung (Abb.13) mit und ohne Thiosulfatdesulphydrase, so erkennt man, dass in den Ansätzen mit Enzym stets weniger Thiosulfat gefunden wurde als in den enzymfreien. Auch durch

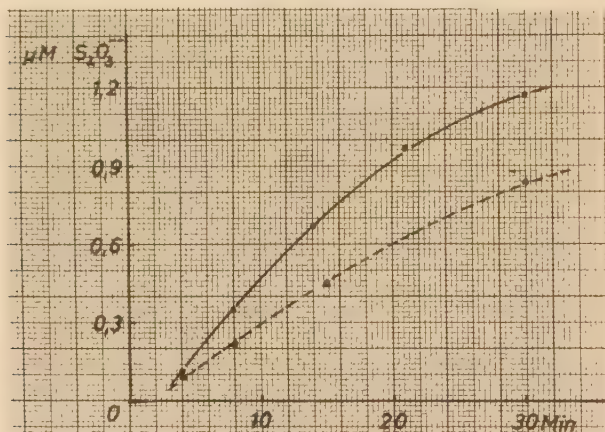


Abb.13

Kinetik der Thiosulfatbildung aus Cysteinsulfosäure und H_2S .

— ohne Thiosulfatdesulphydrase,

---- mit Thiosulfatdesulphydrase

Die Ansätze enthielten: 5 μM Cysteinsulfosäure; 2 μM H_2S ; M/20 Tris pH 7.5; Endvolumen 2.1 ml. Inkubation bei Raumtemperatur. Thiosulfat wurde nach Sörbo bestimmt.

Variation der Konzentrationen der beteiligten Substanzen änderte sich dieses Bild nicht. Die Versuche lassen nur die Deutung zu: das durch die spontane Reaktion entstandene Thiosulfat wird auf einem anderen Reaktionsweg, dem enzymatischen, wieder abgebaut. Das Bunte'sche Salz scheidet damit als mögliches Zwischenprodukt der enzymatischen Reaktion aus. Es liegt hier einer der selteneren Fälle vor, wo die Natur den Reaktionsweg des Reagenzglases nicht befolgt.



Die Teilreaktion (2) stellt die Umkehrung der Disulfidaufspaltung durch Sulfit dar. Nach Schöberl und Bauer lassen sich auf diese Weise gemischte Disulfide darstellen. Die Reaktion kann man mit Hilfe der TPNH-Glutathionreduktase verfolgen. Im System Cysteinsulfosäure, GSH, TPNH und Glutathionreduktase ist die Geschwindigkeit der TPNH-Oxydation proportional der Konzentration an Cysteinsulfosäure (Abb.14).

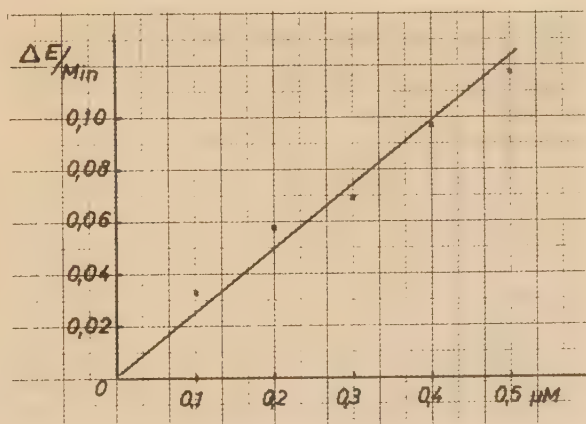


Abb.14

Geschwindigkeit des TPNH-Verbrauchs in Abhängigkeit zur eingesetzten Menge Cysteinsulfosäure. System: 1 mg Serumalbumin; 5 μM Trilon B 0,64 μM TPNH; 5 μM GSH; GSSG-Reduktase; Glycylglycinpuffer pH 7.7, Endvolumen 1,0 ml; Temp. 25°C. Nach Start mit 0.1 - 0.5 μM Cysteinsulfosäure wurde die Abnahme der Extinktion bei 366 mμ und der Schichtdicke 10 mm verfolgt. Abzisse: μM Cysteinsulfosäure; Ordinate: über die Zeit von 1-6 Min gemittelte Abnahme der Extinktion je Minute.

Trägt man den Verbrauch von TPNH gegen die eingesetzte Menge Cysteinsulfosäure auf, so erhält man (Abb.15) eine Gerade.

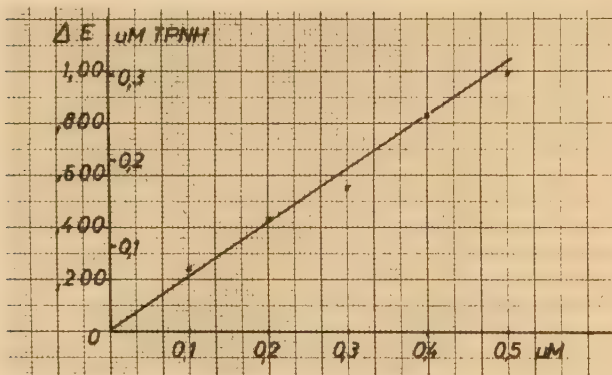
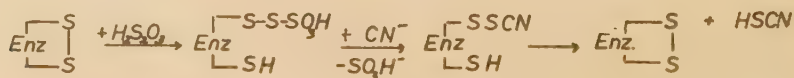


Abb. 15

TPNH-Verbrauch gegen die eingesetzte Menge Cysteinsulfosäure. Erklärung s. Legende zu Abb.14.

Es wird jedoch stets weniger TPNH oxydiert, als der eingesetzten Menge an Cysteinsulfosäure entspricht. Die Kurve verläuft flacher als gefordert. Bei der Reaktion des Bunte'schen Salzes mit Glutathion kann ausser den gemischten Disulfiden auch GSSG und Cystin entstehen. Letzteres wird im Test nicht erfasst, so dass die Kurve naturgemäss flacher ausfallen muss.

Da das Bunte'sche Salz als Zwischenprodukt der enzymatischen Reaktion ausschied, blieb nur die andere Erklärung übrig: Man muss annehmen, dass die gesamte Reaktion am Enzym abläuft, ohne dass Zwischenprodukte frei werden. Für die Rhodanese der Leber hat Sörbo⁴⁸⁾ einen Mechanismus vorgeschlagen, nach welchem Thiosulfat mit einer Disulfidbrücke des Enzyms reagiert:



Für eine Disulfidaufspaltung durch Thiosulfat konnte in der Literatur nur ein Hinweis gefunden werden: Szczepkowski isolierte aus einer Reaktion zwischen Cystin und Thiosulfat eine neue Aminosäure, welcher er die Konstitution einer Cystein-thiosulfonsäure zuschreibt.



Fussend auf der Überlegung, dass weder Thiosulfat noch Disulfid, wohl aber das Mercaptan den blauen Farbstoff 2,6-Dichlorphenolindophenol unter Entfärbung reduziert, musste es möglich sein, die Reaktion () optisch zu verfolgen. Die Lage des Gleichgewichtes durfte dabei keine Rolle spielen, da das Cystein durch die Reaktion mit dem Farbstoff der Rückreaktion entzogen wird. In der Tat kann eine Kombination von Cystin und Thiosulfat 2,6-Dichlorphenolindophenol entfärben, während jedes für sich unwirksam ist (Abb.16).

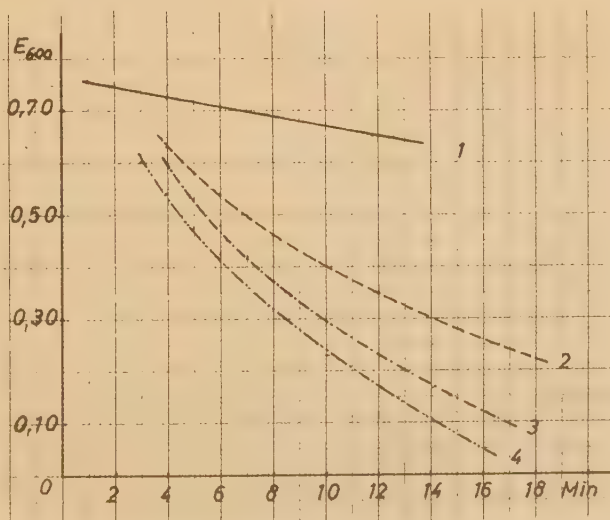


Abb.16

Reaktion zwischen Cystin und Thiosulfat.

System: 2.80 ml M/20 Tris pH 7,6; 0.08 ml 2,6-Dichlorphenolindophenol-Lösung; 0.06 ml/M/l $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (= 60 μM); Start mit 2-6 μM Cystin. Abnahme der Extinktion bei 600 μm verfolgt im Beckmann Spektrophotometer DU. Kurve 1: ohne Cystin; 2: 2 μM Cystin; 3: 4 μM Cystin; 4: 6 μM Cystin.

8. Weitere zum Schwefelstoffwechsel gehörende Enzymreaktionen, die durch das Trockenpulverpräparat katalysiert werden

Ausser dem unaufgeklärten Reaktionsmechanismus der Thiosulfatdesulphydrase blieben noch weitere Fragen: Obgleich die Thiosulfatkonzentration in den Enzymsätzen sehr hoch gewählt wurde ($M/40$), lag sie trotzdem nicht im Sättigungsbereich des Enzyms. Aus der Thiosulfatabhängigkeit der enzymatischen Reaktion ergibt sich nach der Methode von Lineweaver und Burk⁸⁴⁾ eine Michaelis-Konstante von $K_M = 5.5 \cdot 10^{-3}$ (Abb.17). Infolge dieser relativ geringen Affinität des Enzyms zu Thiosulfat entstanden Zweifel, ob diese Verbindung überhaupt das natürliche Substrat ist. Auf der Suche nach dem natürlichen Substrat und der biologischen Wirkungsweise des Enzyms wurden vier weitere Reaktionen des S-Stoffwechsels, die durch das Trockenpulver-Präparat katalysiert werden, aufgefunden. Die Situation wurde dadurch eher noch verworrener. Im folgenden wird über diese Reaktionen berichtet.

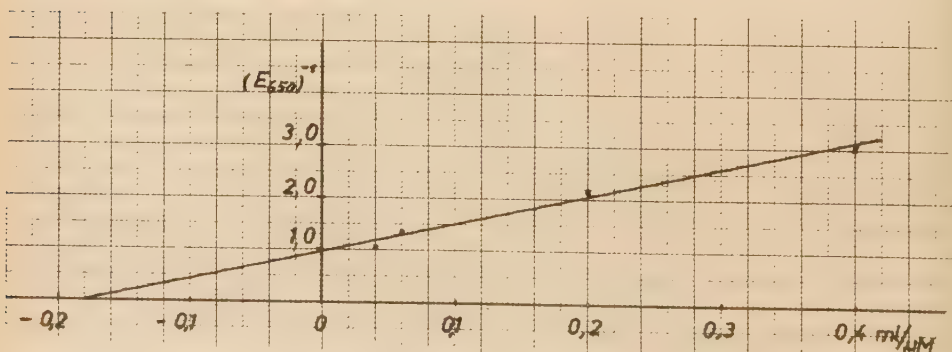


Abb.17

Substratabhängigkeit der Thiosulfatdesulphydrase in der Darstellungsweise von Lineweaver und Burk.
Abzisse: reziproke Wert der S_2O_3 Konzentration.

$$-\frac{1}{K_M} = -0.18; \quad K_M = 5.55 \cdot 10^{-3}$$

a) β -Mercaptobrenztraubensäuredesulphydrase

Eine sehr verdünnte Lösung des Trockenpulver-Präparates setzt unter den Bedingungen der Thiosulfat-Reduktion aus β -Mercaptobrenztraubensäure Schwefelwasserstoff in Freiheit. Glutathion oder Cystein ist dabei nicht mehr erforderlich, da der Überschuss an BMP zur Reduktion offenbar ausreicht. Der Umfang der H_2S -Bildung ist proportional der eingesetzten Enzymmenge. Die Mercaptopyruvatdesulphydrase-aktivität wird in der gleichen Weise gemessen wie die Thiosulfatdesulphydrase. Auch im optischen Test kann man die Reaktion verfolgen (Abb.18). Aus einer im optischen Test er-

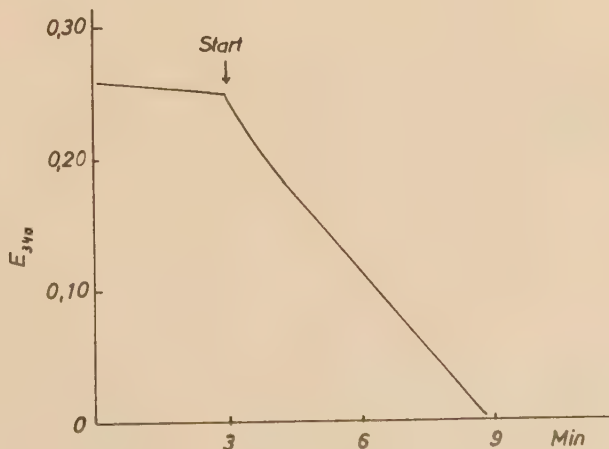


Abb.18

Verfolgung der BMP-desulphydrase-Reaktion im optischen Test. System: 2 mg Serumalbumin; 1.2 μM BMP; 1.2 μM GSH; TPNH; GSSG-Reduktase M/10 Phosphat pH 7.0. Endvol. 2,7 ml. Nach Start mit Enzym wurde die Reaktion im Beckmann Spektrophotometer DK 1 bei 340 m μ verfolgt.

mittelten BMP-Abhängigkeit (Abb.19) wurde eine Michealiskonstante von $K_M = 4 \cdot 10^{-3}$ berechnet.

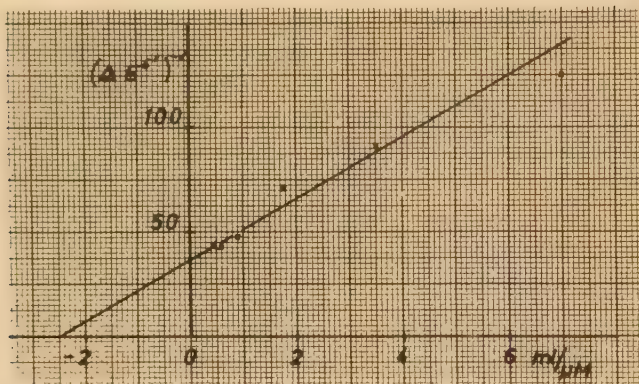


Abb.19

Substratabhängigkeit der BMP-desulphydrase in der Darstellungsweise nach Lineweaver und Burk. System: 2 mg Serumalbumin; 0.5 μ M GSH; TPNH; 0.38 - 6.14 μ M BMP; GSSG-Reduktase; M/10 Phosphat pH 7.0, Endvol. 2.7 ml TPNH-Abnahme im Beckmann Spektrophotometer DK 1 bei 340 m μ verfolgt. Abzisse: reziproke BMP-Konzentration (ml/ μ M); Ordinate: reziproke Abnahme der optischen Dichte zwischen 0 und 6 Min. nach Start mit Enzym.

b) β -Mercaptobrenztraubensäure-Cyanid-Transsulfurase

Das Trockenpulverpräparat katalysiert ferner eine Übertragung des Schwefels von BMP auf Cyanid, wobei Rhodanid entsteht. Die Menge des gebildeten Rhodanids ist proportional der eingesetzten Enzymkonzentration (Abb.20 siehe nächste Seite). Der für die Reaktion günstigste pH-Bereich liegt oberhalb von pH 9.5. Die pH-Abhängigkeit konnte jedoch (Abb.21 siehe nächste Seite) nur bis pH 9.7 verfolgt werden, da bei höheren Werten eine spontane Reaktion zu grosse Ausmasse annimmt und β -Mercaptobrenztraubensäure in alkalischer Lösung instabil ist. Aus der Substratabhängigkeit (Abb. 22 siehe Seite 40) berechnet man die Michaeliskonstante für β -Mercaptobrenztraubensäure zu $2.08 \cdot 10^{-3}$.

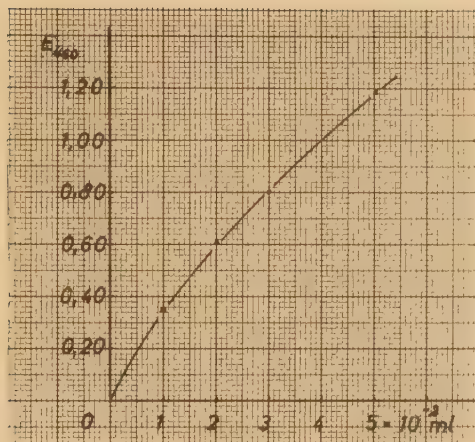


Abb.20

Enzymabhängigkeit der BMP-Cyanid-Transsulfurase.
System: 20 μM BMP; 20 μM KCN; M/10 sec. Phosphat,
Endvol. 2.1 ml. 30 Min bei 37°C inkubiert. Stop mit 0.5 ml
30%igem Formaldehyd. Nach Zugabe von 1 ml Fe-Reagenz
auf 5.00 ml aufgefüllt mit Wasser und die Extinktion
bei 460 μm gegen Blindwert gemessen.

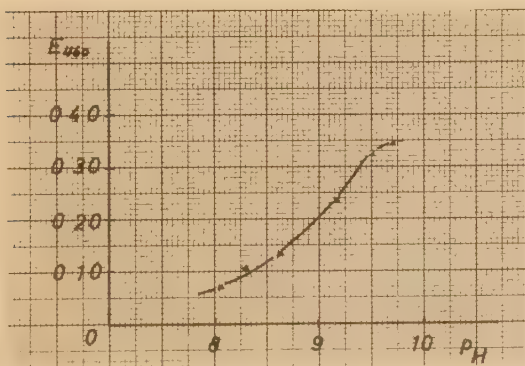


Abb.21

pH-Abhängigkeit der BMP-Cyanid-Transsulfurase.
System: 10 μM BMP; 20 μM KCN; M/20 Trispuffer, Endvol.
2.0 ml. Vor Inkubation des Enzyms pH mit der Elektrode
gemessen. Inkubation s. Legende zu Abb.20.

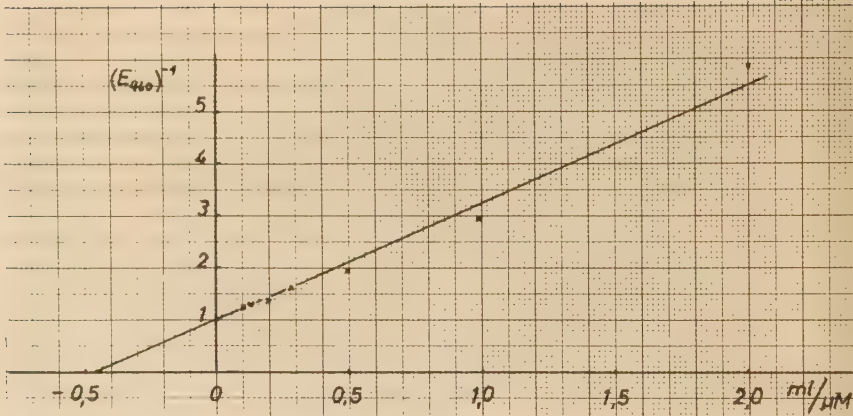


Abb.22

Substratabhängigkeit der BMP-Cyanid-Transsulfurase in der Darstellungsweise nach Lineweaver und Burk.
System: 20 μM KCN; 1 - 20 μM BMP; M/20 Tris pH 9.3, Endvol. 2.0 ml. Inkubation und Messung s. Legende zu Abb.20.
Abzisse: reziproke BMP-Konzentration (ml/ μM). Ordinate: reziproke Extinktion bei 460 mu.

c) Thiosulfat-Cyanid-Transsulfurase (Rhodanese)

Das Trockenpulver katalysiert aber auch eine Übertragung des Thiosulfat-Schwefels auf Cyanid. Dies entspricht völlig der Wirkungsweise der Rhodanese, welche in Leberpräparaten erstmalig von Lang⁴⁹⁾ nachgewiesen und später von Sörbo⁴⁸⁾ aus Rinderleber angereichert und kristallisiert wurde. In der Abb.23 (siehe nächste Seite) wurde eine Enzymabhängigkeit der Hefe-Rhodanese wiedergegeben. Das pH-Maximum dieser Enzymreaktion (Abb.24 siehe nächste Seite) liegt zwischen 9.5 und 10.5.

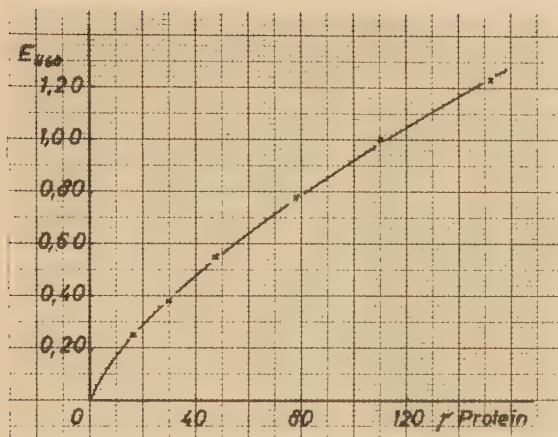


Abb. 23

Enzymabhängigkeit der Heferhodanase des Trockenpulvers.
 System: 20 μM KCN; 100 μM $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$; M/20 Tris pH 9.3,
 Endvol. 2.0 ml. Inkubation und Messung s. Legende zu
 Abb.20.

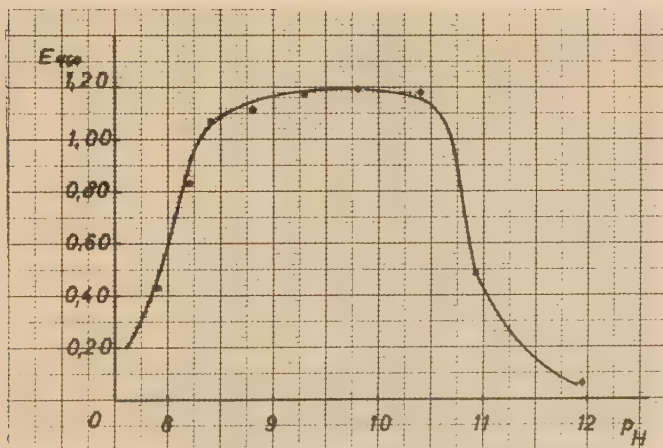


Abb.24

pH-Abhängigkeit der Heferhodanase des Trockenpulvers.
 System : 20 μM KCN; 100 μM $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$; pH 7.9 - 9.8 Trispuffer,
 pH 10 - 12 M/10 Glycokollpuffer, Endvol. 2.0 ml.
 Inkubation und Messung s. Legende zu Abb.20.

Aus der Cyanidabhängigkeit (Abb.25) erkennt man die Konzentration der halben Maximalgeschwindigkeit $K_M = 9.1 \cdot 10^{-4}$.

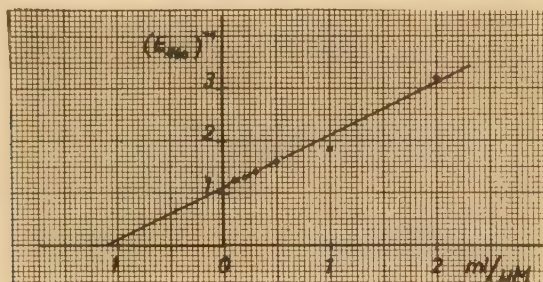


Abb.25

Cyanid-Abhängigkeit der Rhodanese in der Lineweaver-Burk Form. System: 50 μM $S_2O_3^{2-}$; 1-18 μM Cyanid; M/10 Glycinpuffer pH 9.7, Endvol. 2.0 ml. Inkubation und Messung s. Legende zu Abb.20.

Wie im Falle der Thiosulfatdesulphydrase konnte die Sättigungskonzentration des Thiosulfats nicht erreicht werden. Aus der Thiosulfatabhängigkeit der Rhodanese (Abb.26) ermittelt man nach der Methode von Lineweaver und Burk die Michaeliskonstante $K_M = 2 \cdot 10^{-2}$.

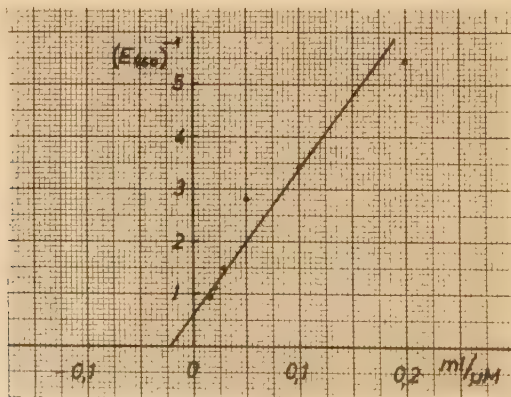


Abb.26

Thiosulfatabhängigkeit der Rhodanese in der Lineweaver-Burk-Form. System: 20 μM KCN; 10-130 μM $S_2O_3^{2-}$; M/10 Glycinpuffer pH 9.7. Endvol. 2.0 ml. Inkubation und Messung s. Legende zu Abb.20.

d) Mercaptobrenztraubensäure-Sulfit-Transsulfurase

Wenn das Trockenpulver den Schwefel sowohl von der β -Mercaptobrenztraubensäure als auch vom Thiosulfat auf Cyanid überträgt, dann sollte man auch eine Übertragung von BMP auf Sulfit unter Bildung von Thiosulfat erwarten können. In der Tat lässt sich auch diese Reaktion nachweisen. In Abb.27 ist eine Enzymabhängigkeit der β -Mercaptobrenztraubensäure-Sulfit-Transsulfurase wiedergegeben.

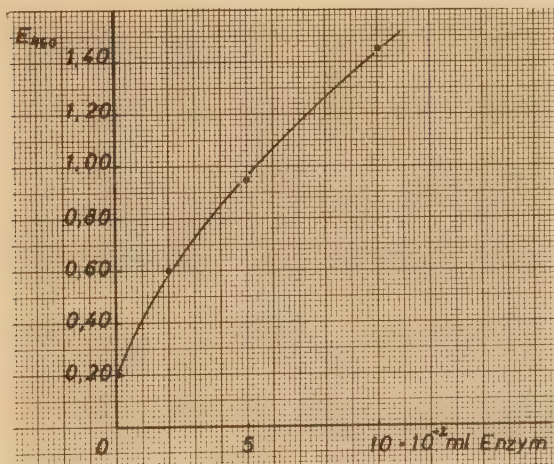


Abb.27

Enzymabhängigkeit der BMP-Sulfit-Transsulfurase-Reaktion.
System: 10 μ M BMP; 5 μ M Sulfit; M/20 Tris pH 9.3.
Endvol. 2.00 ml. 30 Min bei 37°C inkubiert. Thiosulfat
nach Sörbo zu Rhodanid umgesetzt und bei 460 m μ ge-
messen.

9. Versuche zur Anreicherung der Thiosulfatdesulphydrase resp. Rhodanese mittels moderner Methoden der Chromatographie an Harz- und Celluloseaustauschersäulen

Die im voranstehenden Abschnitt beschriebenen neuen Enzymreaktionen des Hefetrockenpulvers warfen eine Reihe weiterer Fragen auf: Werden alle diese Schwefelübertragungs- und Desulphydrierungsreaktionen von ein und demselben Enzym katalysiert, oder existiert für jede Reaktion ein spezielles Enzym? Auch die dritte Möglichkeit, die Existenz je eines Enzyms für die Substrate β -Mercaptobrenztraubensäure und Thiosulfat, war zu erwägen. Diese Fragen lassen sich nur durch weitere Anreicherung und Reinigung der betreffenden Enzyme entscheiden. Die hohe Stabilität der Thiosulfatdesulphydrase liess eine Reinigung des Enzyms mit Hilfe moderner chromatographischer Methoden aussichtsreich erscheinen. Da von allen in Frage kommenden enzymatischen Fähigkeiten die Rhodanesereaktion am leichtesten und exaktesten zu prüfen ist, wurde diese im allgemeinen zur Messung der enzymatischen Aktivität herangezogen. Dabei wurde von der Voraussetzung ausgegangen, dass Thiosulfatdesulphydrase und Hefe-Rhodanese identische Enzyme seien.

a) Papierelektrophorese des Trockenpulverpräparates

Bevor jedoch Versuche an Harz und Celluloseaustauschern in Angriff genommen wurden, schien es angebracht, einen Bereich für den isoelektrischen Punkt des Enzyms abzugrenzen, in dem eine Adsorption weder an Kationen- noch an Anionenaustauschern zu erwarten ist. Zu diesem Zweck wurde eine konzentrierte Lösung des Trockenpulvers auf einen mit Phosphatpuffer getränkten Papierstreifen aufgetragen und einer Niederspannungselektrophorese unterworfen. Diese dauerte im allgemeinen 12 Stunden bei einer Feldstärke von 5.7 V/cm. Nach Abschalten der Spannung wurde das Papier längs in zwei gleichbreite Streifen geschnitten. Auf dem einen Streifen wurden die Proteinzonen nach Grassmann⁵⁰⁾ mit Amidoschwarz in

Methanol angefärbt. Die so kenntlich gemachten Proteinzonen wurden nun auf dem zweiten Streifen ausgeschnitten und mit dem Papier im Methylenblau-Test auf ihre Thiosulfatdesulphydrase-Aktivität geprüft. Dieses grob-qualitative Verfahren genügte vollauf für die Aussage, ob die enzymatische Aktivität bei dem betreffenden pH des Puffers zur Anode oder zur Kathode gewandert war. In der Abb.29(siehe nächste Seite) sind diese Versuche wiedergegeben. Wie man aus den Bildern erkennt, liegt der isoelektrische Punkt des Enzyms im pH-Bereich 6.2 bis 7.0

b) Adsorption an Amberlite IRC 50 XE 64

Aus den Versuchen der Niederspannungselektrophorese ging hervor, dass das Enzym bereits im schwach sauren Gebiet als Kation vorliegt. Es wurde daher zunächst eine Adsorption an einem Kationenaustauscher angestrebt. Die Wahl des Austauschers fiel auf Amberlite IRC 50 XE 64, da sich dieses Harz in der Praxis der Protein- und Enzymchemie bereits bewährt hat. Eine Übersicht findet man bei Hirs⁵¹⁾. Als Beispiele werden Ribonuclease A, Chymotrypsinogen und Eiweiss-Lysozym angeführt. Einen schönen Erfolg erbrachte die Methode bei der Reinigung des Cytochroms c verschiedenster Provenienz in Arbeiten von Margoliash⁵²⁾, Neilands⁵³⁾ und Okunuki⁴³⁾. Der zuletzt genannte Autor konnte durch zweimalige Adsorption an dem sehr ähnlichen Harz Duolite CS 101 das Cytochrom c aus Hefe bis zur Kristallisation reinigen.

Jeder Austauscher hat eine charakteristische Titrationskurve, deren flacher Ast an die Neutralisation einer schwachen Säure oder Base erinnert. Man arbeitet am günstigsten in diesem flach gestreckten Kurvenbereich, da dort starke pH-Schwankungen weniger zu befürchten sind. Auf Grund der Titrationskurve des Austauscherharzes Amberlite IRC 50 XE 64 (Abb29, siehe S.47) würde man ein Arbeiten um pH 7.0 empfehlen. Tatsächlich verwenden alle oben genannten Autoren ein mit verdünntem Puffer von pH 7.0 equilibriertes Harz.

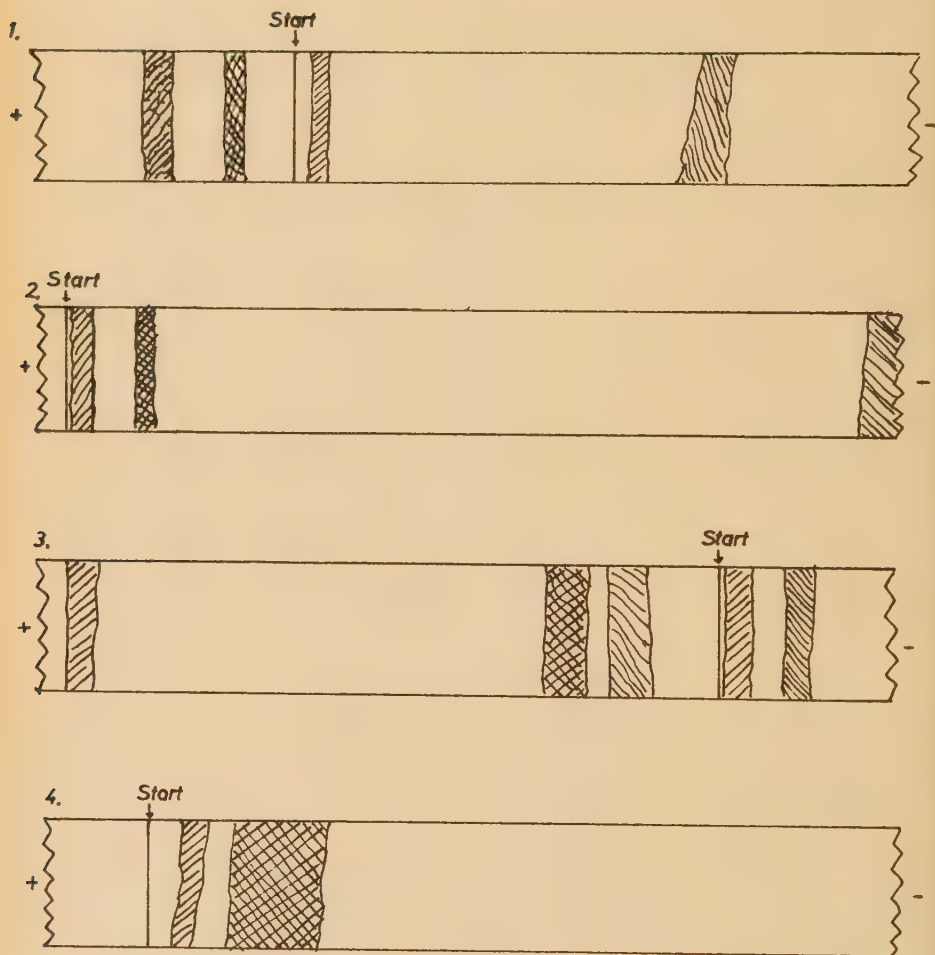


Abb.28.

Papierelektrophorese der Thiosulfatdesulphydrase.
 Spannungsabfall: 200 V; Stromstärke: 2 mA; Dauer: ~12 Stdn.;
 Puffer: M/15 Phosphat 1) pH 7.0, 2) pH 6.2, 3) pH 8.0,
 4) pH 5.5; enzym. aktive Zone: ~~///~~

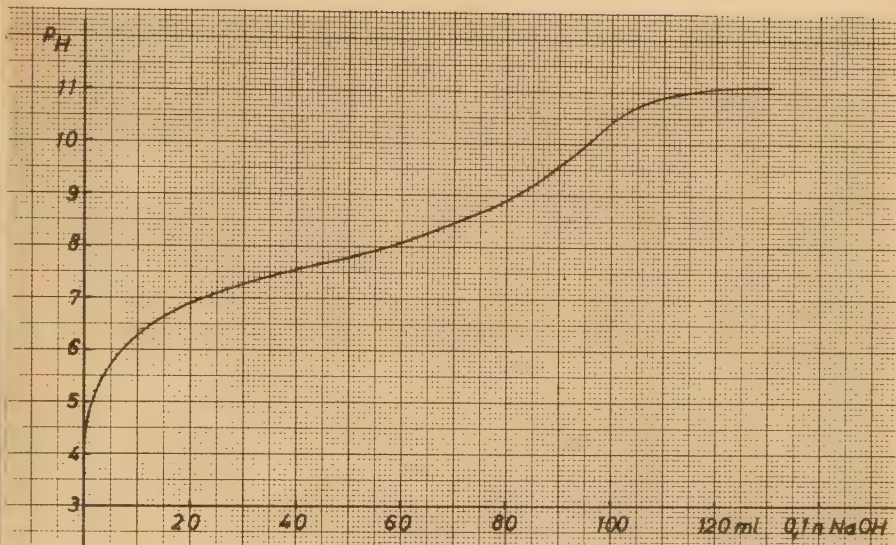


Abb.29

Titrationsskurve von Amberlite IRC 50 XE 64
 5.0 ml feuchten Austauscher in der H^+ -Form wurde in
 75 ml dest. Wasser suspendiert. Unter Rühren mit einem
 Magnetstab wurde aus einer Burette n/10 NaOH zugetropft.
 Der pH-Verlauf wurde mit einer Glaselektrode beobachtet.

Wie aber zu erwarten war, wird die Thiosulfatdesulphydrase- und Rhodanese-Aktivität durch eine Amberlite XE 64-Säule, die mit m/200 Phosphatpuffer vom pH 7.0 equilibriert ist, nicht adsorbiert, sondern läuft quantitativ durch. Eine wesentliche Anreicherung wird dadurch nicht erzielt.

Dagegen wird das Enzym bei niedriger Ionenstärke von einer auf pH 6.0 - 6.2 eingestellten Säule vollständig zurückgehalten, während etwa 37 - 45 Prozent des aufgetragenen Proteins nicht adsorbiert wurde.

Die ersten informativsten Versuche wurden an Mikrosäulen mit 1 - 2 ml Austauscher durchgeführt. Die Säulen wurden mit etwa 3 - 5 mg Protein beladen. Die Aktivität liess sich aber nur bei Anwendung drastischer Mittel vom Austauscher

wieder ablösen. Elution mit dem 10fachen Säulenvolumen M/10 sec.Phosphat ist wirkungslos. Erst nach Durchlaufen von etwa zwei Säulenvolumina M/1 sec.Phosphat erscheint die Aktivität im Eluat. Von derartigen Methoden kann man jedoch keine selektive Wirkung erwarten. Unter zahlreichen Versuchen mit verschiedenen Puffern zeitigte M/10 Pyrophosphat das beste Ergebnis. Zudem konnte eine weitere Verbesserung erzielt werden: Man kann den dialysierten Ammoniumsulfat-Extrakt ohne vorhergehende Gefriertrocknung auf die Säule auftragen. Dieser zeitraubende und verlustreiche Schritt kann dadurch eingespart werden. 90 - 100% der Aktivität wurde aus den Microsäulen zurückerhalten.

Die aus den Mikroversuchen gewonnenen Erkenntnisse wurden nun auf grössere Säulen übertragen. Die Abb.30 zeigt den Verlauf der Elution an einer Säule mit 33 ml Austauscher.

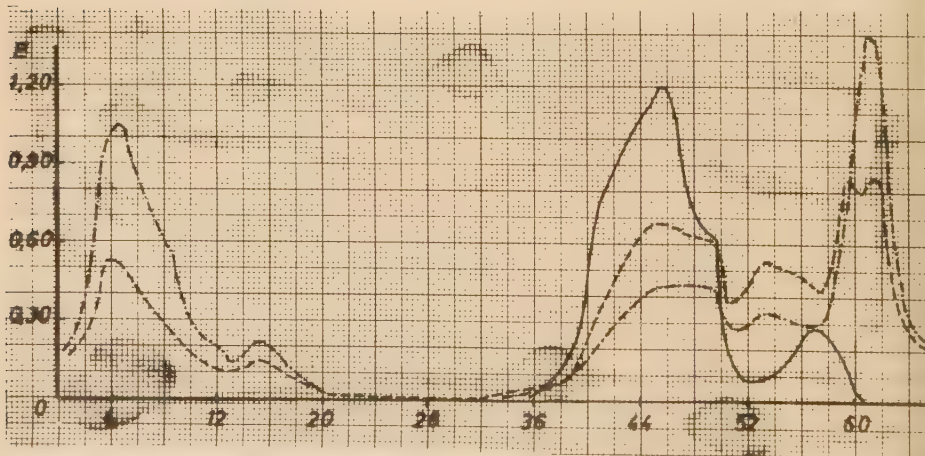


Abb.30

Chromatographie der Heferhodanese an Amberlite XE 64-Säule (33 ml).

Volumen der einzelnen Fraktionen: 7.5 ml. Bis Fr.12 eluiert mit M/10 K_2HPO_4 , dann mit M/10 $Na_2P_2O_7$.

---: Extinktion bei 280 mu (E_{280}); ----: Extinktion bei 260 mu (E_{260}); -.-: Aktivität/0.01 ml Eluat ($E_{460}/0.01$).

In den aufgefangenen Fraktionen wurde Protein nach der optischen Methode von Warburg durch Messen der Lichtabsorption bei 280 und 260 m μ in einer 5 mm Quarzkuvette bestimmt. Das Mass für die Rhodanese-Aktivität war die Lichtabsorption des roten Eisenrhodanid-Komplexes bei 460 m μ , die aus einer Inkubation des Enzyms unter den festgelegten Bedingungen (näheres im experimentellen Teil) resultierte. Die spezifische Aktivität der Rhodanese wurde definiert als das Verhältnis der Lichtabsorption bei 460 m μ , die eine bestimmte Proteinmenge verursachte, zur eigenen Absorption bei 280 m μ einer Lösung dieser Proteinmenge in 1.0 ml Wasser bei einer Schichtdicke von 5 mm. In dem Beispiel der Abb.30 findet man nach Zusammenfassen der aktiven Fraktionen des ersten Aktivitätsberges eine Erhöhung der spezifischen Aktivität von 48 auf 159, also um das 3.3fache. Die spezifische Aktivität erhielt das Symbol Q^{280} . Die wirkliche Anreicherung ist jedoch bedeutend höher. Denn das Verhältnis der optischen Dichte bei 280 und 260 m μ , nach Warburg ⁵⁴⁾⁵⁵⁾ mit β_{260}^{280} bezeichnet, nimmt in den enzymatisch aktiven Fraktionen Werte über 1 an. Insgesamt steigt β_{260}^{280} von 0.98 auf 1.61. Dies entspricht einem Absinken des Gehaltes an Nucleinsäuren von 5 auf 0.5%. Bezieht man die Anreicherung auf das Verhältnis Q_{260}^{460} , wobei man cet.par. die Aktivität auf die Absorption bei 260 statt bei 280 bezieht, so errechnet man aus dem Ansteigen von Q eine 5,5fache Anreicherung. Im Gegensatz zu den Mikroversuchen, bei denen 90 - 100% der Aktivität wiedergewonnen wurde, unterlag die Ausbeute aus 20 - 200 ml Säulen erheblichen Schwankungen. Sie erreichte selten 50%. Diese Diskrepanz findet ihre Erklärung in der 10 - 15fachen Verweilzeit des Enzyms am Austauscher. Die Ausbeute war im allgemeinen um so besser, je schneller das Enzym die Säule wieder verliess. Der Übertragung dieses Reinigungsschrittes in den Grossmasstab war also eine gewisse Grenze gesetzt. Denn das Durchlaufen des 5-8fachen Säulenvolumens an Puffer nimmt bei grösseren Säulen erheblich mehr Zeit in Anspruch als bei kleinen.

Ausserdem sind die grösseren Säulen der Gefahr des Zerspringens infolge Ausdehnung des Harzes während der Elution weit mehr ausgesetzt.

Noch ein weiterer Schönheitsfehler haftete den Grossansätzen an: Die Aktivität kam viel weniger scharf und die drei Maxima flossen ineinander über. Um daher aus der Amberlite-Säule eine gewisse Menge des aktiven Proteins zu gewinnen, an der weitere Reinigungsoperationen durchgeführt werden konnten, musste das Verfahren der Elution radikal geändert werden.

Zwei Mittel sind gebräuchlich, um ein Protein von einem Austauscher abzulösen; Umladung des Proteins durch pH-Verschiebung und Verdrängung des Proteins durch Erhöhung der Ionenstärke. Das erste Verfahren stösst bei Austauschern von hoher Kapazität auf Schwierigkeiten. Denn in einer solchen Säule verschiebt sich das pH nicht linear, sondern wandert in der Form einer Grenzzone. Je nach Art und Konzentration des durchlaufenden Elektrolyten ist diese mehr oder weniger scharf ausgebildet. In dem Beispiel der Abb.31 wurde das Enzym mit

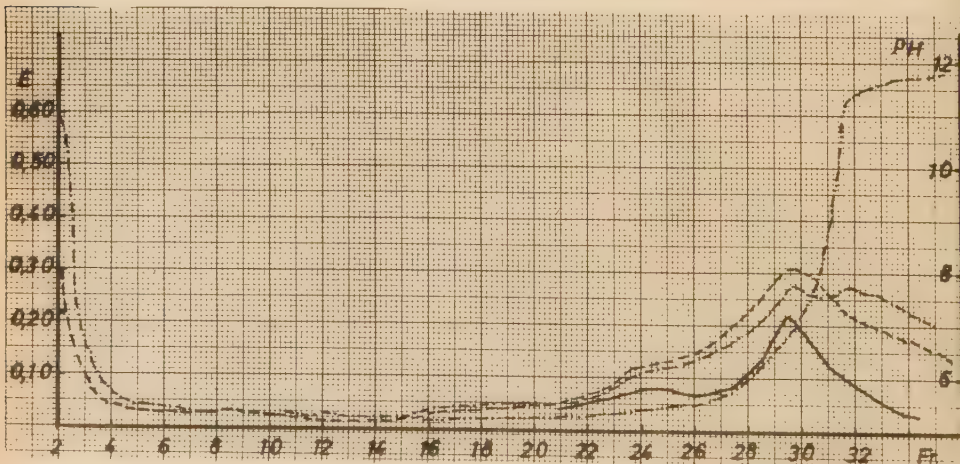


Abb.31

Elution von Amberlite XE 64 mit M/10 tert. Kaliumphosphat. Säulenvol. 25 ml. Erklärung s. Legende zu Abb.30.

----- Kurve: pH des Eluats.

M/10 tert. Kaliumphosphatlösung eluiert. Man erkennt die sprunghafte Veränderung des pH, die nur mit der Ausbildung einer scharfen Grenzzone innerhalb der Säule zu erklären ist. Es leuchtet ein, dass das pH des Eluats infolge der hohen Kationenkapazität des Austauschers zunächst absinken muss. Die Aktivität erscheint bereits bei einem überraschend niedrigem pH im Eluat, nämlich bei pH 5.2. Die Nachprüfung eines Versuchs mit M/10 Pyrophosphat-Lösung als eluierende Flüssigkeit ergab, dass die Aktivität in diesem Falle sogar noch früher, nämlich bereits bei pH 4.9 die Säule verlässt. Die Verwendung von tert. Phosphat (Abb.31) führte zu keiner brauchbaren Trennung. Auch der Versuch, mit 0.2 M Tris-Lösung zu eluieren, mißlang.

Aus der Beobachtung des pH-Verlaufes der Austauscher-Operation kann man jedoch entnehmen, dass sich das Enzym schon mit schwach sauren Lösungsmitteln vom Harz ablösen lässt. Könnte man das Enzym vielleicht im schwach sauren Gebiet zwischen pH 5 und 6 durch Erhöhung der Ionenstärke selektiv von der Säule verdrängen? Der in Abb.32 wiedergegebene Versuch bestätigte diese Erwartung.

Abb.32 siehe nächste Seite

c) Adsorption an Carboxymethyl- und DEAE-Cellulose

Unter den modernen Verfahren der Protein-Chemie verdient die von Peterson und Sober⁵⁶⁾ eingeführte Chromatographie an Celluloseaustauschersäulen besondere Beachtung. Die Autoren beschreiben ein Verfahren zur Darstellung von Carboxymethylcellulose, welche Eigenschaften eines Kationenaustauschers besitzt, und von Diäthylaminoäthylcellulose, eines Anionenaustauschers. Beide Präparate sind bereits im Handel erhältlich. Trotz ihrer vergleichsweise geringen Ionenkapazität besitzen diese Austauscher ein hohes Adsorptionsvermögen gegenüber Proteinen. In einer zweiten Arbeit

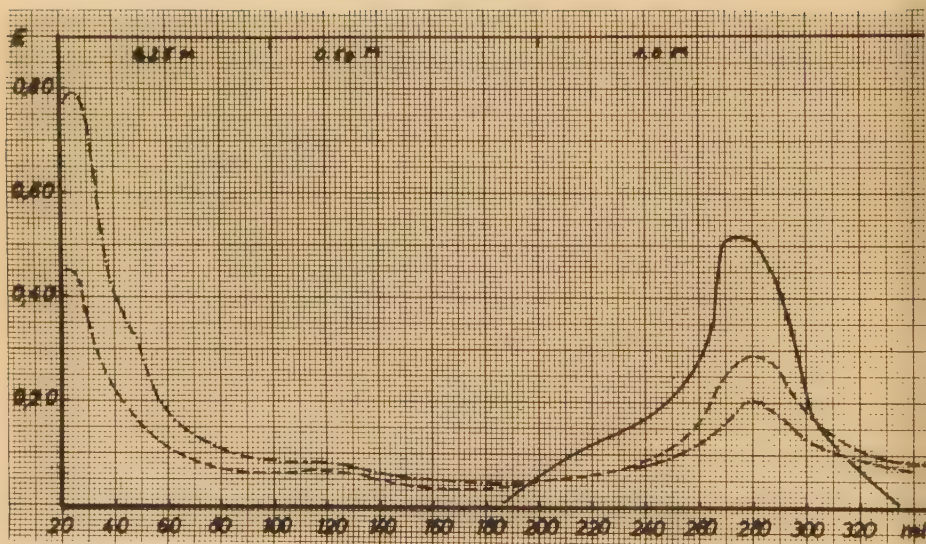


Abb.32

Elution von Amberlite XE 64 mit steigenden Konzentrationen K-Phosphat pH 5.0.
Erklärung s. Legende zu Abb.30

beschreiben die genannten Autoren zusammen mit Gutter und Wyckhoff⁵⁷⁾ eine Fraktionierung von Serumprotein an der Anionenaustauschercellulose. Auch bei der Reinigung von Enzymen hat man inzwischen gute Erfahrungen mit der DEAE-Cellulose gesammelt. Dagegen finden sich nur wenige Beispiele für Enzymreinigungen über CM-Cellulosesäulen in der Literatur.

Es wurden zunächst mit Trockenpulver-Präparat Versuche

angestellt mit dem Ziel, die Rhodanese-Aktivität an einer CM-Cellulosesäule zu fixieren. Im pH-Bereich 4.7 - 5.9 kam jedoch stets ein beträchtlicher Teil der Aktivität zusammen mit dem nicht adsorbierten Protein. Als Beispiel sei Abb.33 angeführt.

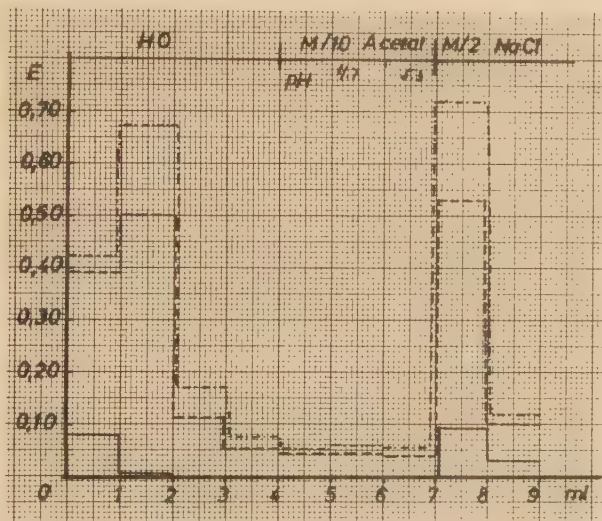


Abb.33

Chromatographie von Trockenpulverenzym an Mikrosäule mit CM-Cellulose. Cellulose war equilibriert mit 0.03 M Acetatpuffer pH 4.7.

Erklärung s. Legende zu Abb.31.

Versuche an DEAE-Microsäulen brachten ähnliche, wenig ermutigende Ergebnisse: Etwa die Hälfte der Aktivität wurde im nicht adsorbierten Protein wiedergefunden. Diese Erscheinungen wurden als "Mitreisseeffekte" des Begleitproteins gedeutet. Denn die Ergebnisse änderten sich grundsätzlich, wenn das Enzym einer Vorreinigung an einer Amberlite-XE-64-Säule unterworfen worden war. Nunmehr konnte die Aktivität

vollständig an einer DEAE-Säule fixiert werden. Man kann annehmen, dass durch den Amberlite-Schritt hauptsächlich anionische Begleitproteine und Nucleinsäuren eliminiert werden, welche durch Besetzung der aktiven Zentren an der DEAE-Cellulose oder durch Symplexbildung mit dem eher kationischen Enzym eine vollständige Adsorption desselben an der DEAE-Säule verhindern. Die Abb.34 (siehe nächste Seite) gibt den Verlauf einer Elution von einer DEAE-Säule wieder. Es wurde eine rund dreifache Anreicherung erzielt.

10. SH-Bedarf der gereinigten Heferhodanese

Eine Überraschung brachte eine Enzymabhängigkeit, die mit einem über Amberlite-Säule und DEAE-Säule gereinigte Rhodanese Präparat ausgeführt worden war (Abb.35).

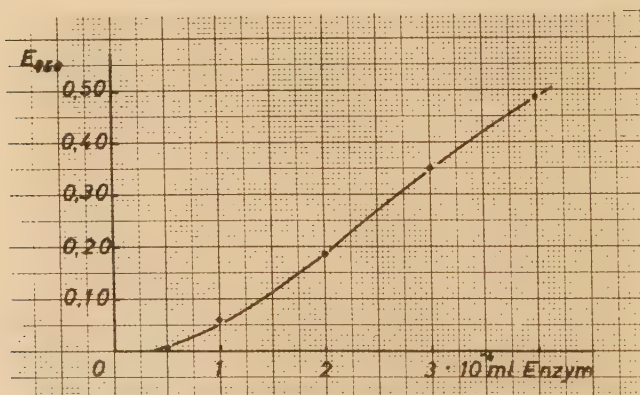


Abb.35

Enzymabhängigkeit des DEAE-Eluats. Das Enzym wurde unter den üblichen Bedingungen mit 100 μM S_2O_3 und 20 μM KCN inkubiert.

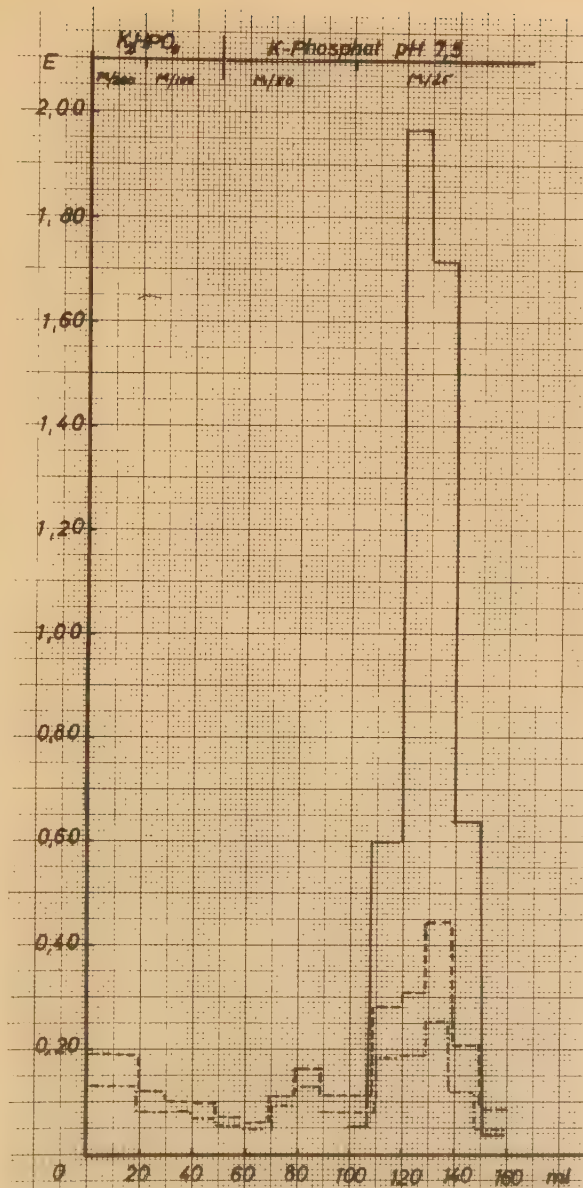
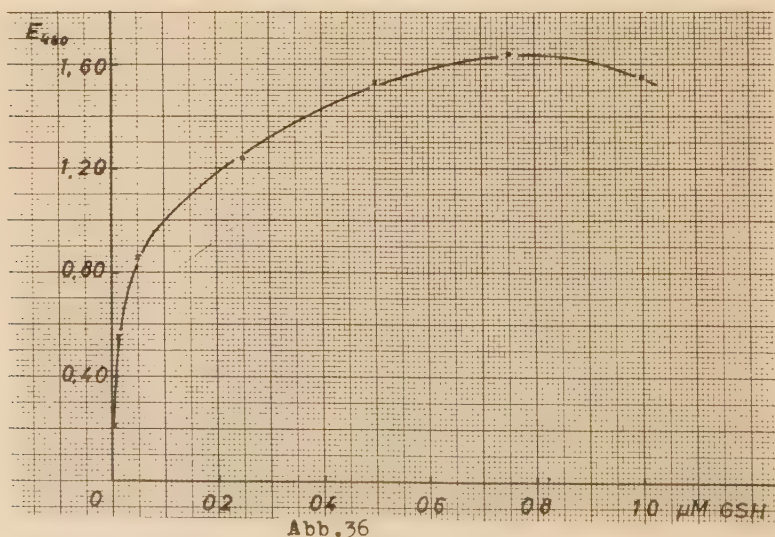


Abb. 34

Elution des an Amberlite XE 64 vorgereinigten Enzyms von einer DEAE-Säule. Säulenvol. 18 ml, DEAE-Cellulose equilibriert mit M/200 K₂HPO₄.
Erklärung s. Legende zu Abb. 30.

Die Enzymabhängigkeit der aktiven Fraktion des Amberlite-Schrittes verläuft über einen weiten Bereich streng linear, während die Kurve des ungereinigten Ammoniumsulfatextraktes mit zunehmender Konzentration leicht abflacht. Die letztere Erscheinung trifft man beim Arbeiten mit rohen Enzympräparaten häufig an. Sie lässt sich auf eine Inaktivierung des Enzyms durch einen im Präparat anwesenden Hemmstoff oder auf die Wirkung einer Protease zurückführen. Dagegen zeigt die Enzymabhängigkeitskurve des hochgereinigten Präparates (Abb.35) eine Aktivierung bei höheren Enzymkonzentrationen an. Kurven dieser Form treten auf, wenn das Enzym infolge zu grosser Verdünnung des Proteins denaturiert oder wenn die Proteinlösung einen aktivierenden Faktor enthält, welcher bei hoher Verdünnung zur geschwindigkeitsbegrenzenden Komponenten wird. Sollte dieser zweite Fall zutreffen, so musste Hefekochsaft die Rhodanese Reaktion aktivieren können. Dies traf auch zu.

Die Aktivierung konnte auf eine Wirkung von SH-Verbindungen zurückgeführt werden. Aus der Glutathionabhängigkeit der Abb.36 erkennt man, dass das Enzym bereits bei einer Konzen-



Glutathionabhängigkeit der Rhodanese-Reaktion. Enzym: DEAE-Eluat. Inkubation unter den üblichen Bedingungen.

tration von 0.3 $\mu\text{M}/\text{ml}$ dieser SH-Verbindung abgesättigt ist. Die Konzentration der halben Maximalgeschwindigkeit liegt bei 0.025 $\mu\text{M}/\text{ml}$. Glutathion kann durch Cystein oder Thioglycolsäure ersetzt werden.

11. Vergleich der Thiosulfatdesulphydrase- und Rhodaneseaktivität

Durch die Reinigungsoperationen an Harz- und Celluloseaustauschersäulen gelang es nicht, Rhodanese und Thiosulfatdesulphydrase voneinander zu trennen. Es änderte sich aber das Verhältnis der beiden Aktivitäten. In der Tabelle 5 werden zwei Präparate, das Trockenpulver der Ammonsulfatextraktion (spez. Rhodaneseaktivität $Q_{280}^{460} = 25$) und das aktive Eluat aus der DEAE-Säule ($Q_{280}^{460} = 588$) hinsichtlich der Rhodanese- und der Thiosulfatdesulphydraseaktivitäten miteinander verglichen.

Tabelle 5

Nr.	Protein	Präparat	E_{460}	E_{650}	E_{650}/E_{460}
1	8.72	Trockenpulver	210	255	1.22
2	17.44	" "	350	465	1.33
3	0.677	DEAE-Eluat	290	115	0.40
4	1.35	" "	370	165	0.45
5	2.70	" "	720	350	0.49

12. Hemmung der Rhodanese und Thiosulfatdesulphydrase durch Sulfit

Heferhodanese und Thiosulfatdesulphydrase werden beide durch Sulfit, das gemeinsame Reaktionsprodukt, empfindlich gehemmt. Wie man aus den Abb.37 und Abb.38 (siehe nächste Seite) erkennt, liegt die Konzentration der 50 prozentigen Hemmung für die Rhodanese bei $5 \cdot 10^{-4}$ und für die Thiosulfatdesulphydrase bei etwa $2.5 \cdot 10^{-4}$ M. Dass sich diese beiden enzymatischen Reaktionen in der Hemmung durch Sulfit um den Faktor 2 unterscheiden, spricht nicht unbedingt gegen eine Identität der Enzyme, da die Testbedingungen hinsichtlich pH (9.3 bzw. 7.5) und Thiosulfatkonzentration (M/20 bzw. M/40) erheblich voneinander abweichen. Es ist jedoch eher die Regel als die Ausnahme, dass enzymatische Reaktionen durch ihre Endprodukte gehemmt werden; daher kann die Sulfit-Hemmung auch nicht als Argument für eine Identität der Enzyme gelten.

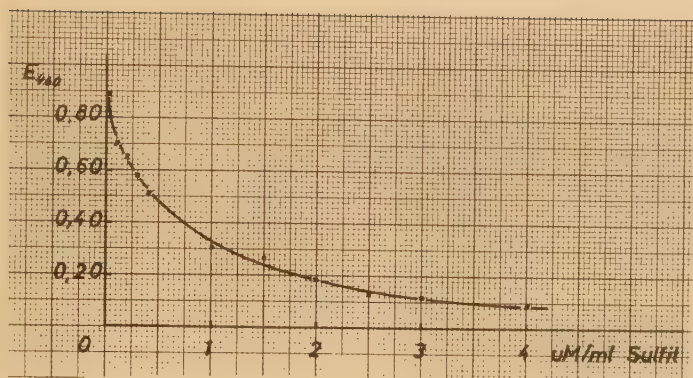


Abb. 37

Hemmung der Rhodanese durch Sulfite; 1.70 ml M/20 Tris pH 9.3; 0.20 ml M/10 KCN; 0.10 ml M/1 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 2 μM Cystein; 0.2 - 8.0 μM Sulfite. 30 min. bei 37°C mit gereinigtem Enzym (DEAE-Eluat) inkubiert.

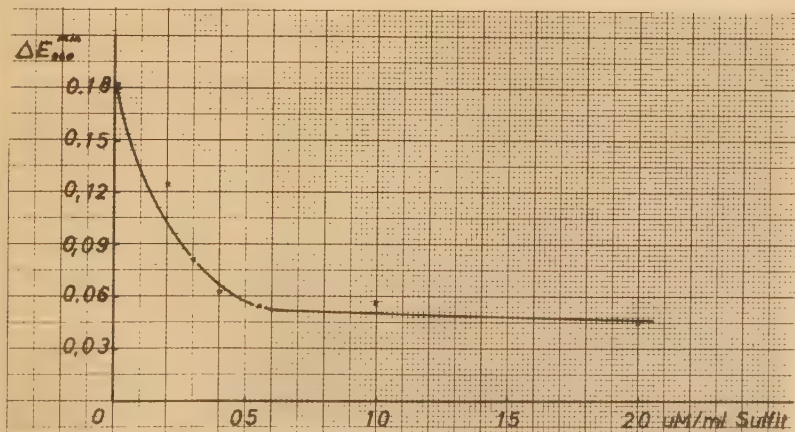


Abb. 38

Hemmung der Thiosulfatdesulphydrase durch Sulfite im optischen Test gekoppelt mit Glutathionreduktase: 0.05 ml 2%ige Albumin-Lösung; 2.5 μM GSH; 25 μM Na-Thiosulfat; 0 - 2.0 μM Na-Sulfite; TPNH, gereinigte Glutathionreduktase, Thiosulfatdesulphydrase (Trockenpulver-Lösung), M/10 Phosphatpuffer pH 7.5 berechnet auf ein Endvolumen von 1.0 ml. Extinktion bei 366 m μ im Spektralphotometer Eppendorf bei 25°C verfolgt.

II. Die Sulfitreduktase der Bäckerhefe

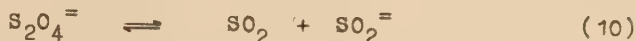
1. Theoretische Einführung in das Problem

Die Reduktion von Thiosulfat zu Sulfit und Schwefelwasserstoff ist - chemisch gesehen - eine ziemlich unkomplizierte Reaktion. Formal bedarf es nur der Anlagerung von einem Molekül Wasserstoff oder der Zuführung von zwei Elektronen, um Schwefelwasserstoff abzuspalten. In vitro kann man bereits mit milden Reduktionsmitteln, z.B. Zinn-II-chlorid, den "labilen Schwefel" des Thiosulfats reduzieren. Wie in I, Abschn.3. dargelegt, sind sogar SH-Verbindungen genügend starke Reduktionsmittel, wenngleich in diesem Falle der Reaktionsweg sicher ein anderer ist als eine bloße Elektronen- oder Wasserstoffübertragung.

Hingegen ist es ungleich schwieriger, aus Sulfit Schwefelwasserstoff darzustellen. Hierzu bedarf es schon drastischer Reduktionsmittel wie beispielsweise naszierenden Wasserstoffs. Da jedoch in saurer Lösung die von den niedrigen Oxydationsstufen sich ableitenden Säuren des Schwefels sämtliche instabil und zum Teil stärkere Oxydationsmittel als schweflige Säure sind, kann man über den Verlauf dieser Reduktion und über Zwischenstufen nichts aussagen. In neutraler oder alkalischer Lösung kann man Sulfit mit Zink oder elektrolytisch zum Sulfid reduzieren. Um die Aufklärung der elektrolytischen Reduktion des Sulfits bemühte sich vor allem Fehér⁵⁸⁾. Dabei entsteht zunächst in bekannter Weise Dithionit. Dieses durchläuft einen Disproportionierungszyclus, aus dem Thiosulfat und Sulfit resultieren:



Wahrscheinlich spielt dabei die Sulfoxylsäure H_2SO_2 eine Rolle, die mit der unter-dischwefligen Säure in einem Gleichgewicht steht (vgl. Wiberg⁵⁹):



Formal ergeben zwei Moleküle Sulfoxylsäure ein Molekül Thio-schwefelsäure:



Aus Thiosulfat entsteht durch Aufnahme von zwei Elektronen Sulfid und Sulfid:

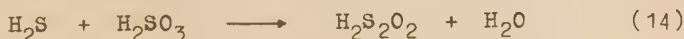


Die Kombination der Reaktionsgleichungen (10) und (11) ergibt die Gleichung (9). Auch bei der Darstellungsweise von Thio-sulfat aus Bisulfid und Sulfid nach der Bruttoformel:



dürfte der Sulfoxylsäure eine intermediäre Rolle zukommen.

Als diese Arbeit aufgenommen wurde, war über den Reaktionsmechanismus der biologischen Reduktion des Sulfits so gut wie nichts bekannt. Der Gedanke, dass Thiosulfat die Vorstufe des Schwefelwasserstoffs sei, welches in einem Disproportionierungszyclus, eingeleitet durch eine Reaktion des Sulfits mit H_2S , entsteht, schien bestechend. Zu den Autoren, die dem Thiosulfat eine intermediäre Rolle bei der Schwefelassimilation zuerkennen, gehören namentlich Hockenhull¹²⁾, Shepherd¹³⁾ sowie Ragland und Liverman³⁴⁾. Allerdings müssten aus dem Cyclus, der durch die Reaktion



mindestens zwei Molekeln Schwefelwasserstoff resultieren, da eine benötigt wird, um den Cyclus in Gang zu halten. Hier liegt die schwache Stelle der Hypothese.

Dennoch wurde zunächst - dem Weg des geringsten Widerstandes folgend - die biologische Reduktion des Thiosulfats in Angriff genommen, obgleich sie, wie sich später zeigte, am eigentlichen Thema, nämlich der biologischen Reduktion des Sulfits, vorbeiführte. An der leicht demonstrierbaren enzymatischen Freisetzung des Schwefelwasserstoffs aus Thiosulfat konnte aber die Methodik entwickelt werden, die schliesslich bei der biologischen Reduktion des Sulfits wenigstens zu einem Teilerfolg führte.

2. Der Einbau von markiertem Sulfit-Schwefel nach Inkubation von Hefeextrakt mit isotopenmarkiertem Sulfit

In meiner Diplom-Arbeit konnte ich den Einbau von markiertem Sulfit-Schwefel in das Cystein durch zellfreie Hefeextrakte nachweisen. Das vollständige System bedurfte folgender Substrate und Cofermente: Glucose-6-phosphat, TPN, Serin und Pyridoxalphosphat. Die beiden letzteren sind Bestandteile des Serinsulphydrase-Systems von Schlossmann und Lynen. Aus den Enzymsätzen wurde das ^{35}S -markierte Cystein durch Oxydation mit Perameisensäure in Cysteinsäure übergeführt und als solche durch Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie isoliert und identifiziert. Die Abb.39 zeigt ein typisches Radiophorogramm aus einer Inkubation von Hefeextrakt mit Radiosulfit.

Abb.39 siehe nächste Seite

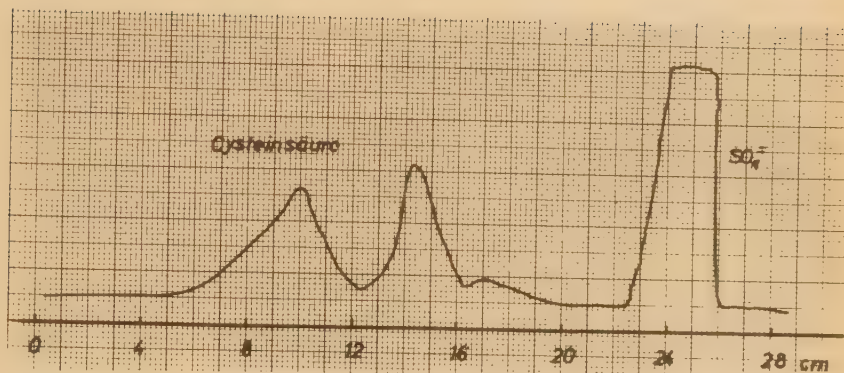


Abb.39

Radiophotogramm: Einbau von Sulfit-Schwefel in Cystein durch einen zellfreien Extrakt aus Bäckerhefe.
 Masstab 1:2.

3. Nachweis von radioaktivem Schwefelwasserstoff nach Inkubation von Hefeextrakt mit isotopenmarkiertem Sulfit

Die Methodik, den Einbau von markiertem Sulfit in das Cystein nachzuweisen, gestaltete sich jedoch so umständlich und zeitraubend, dass sie für einen enzymatischen Test unbrauchbar war. Der Umsatz war auch zu gering, um Cystein nach der Methode von Grunert und Phillips mit Nitroprussidnatrium nachweisen zu können. Dieses Tests bediente sich Schlossmann bei der Reinigung der Serinsulphydrase. Lorch⁶⁰⁾ zeigte jedoch, dass das Enzym nur bei einem hohen Überschuss von Sulfit maximal arbeitet und dass die Reaktion zu einem Gleichgewicht führt. Daher erwies sich die

Verwendung der Serinsulphydrase als Hilfsferment zur Isolierung des Sulfit reduzierenden Systems als ungeeignet. Ausserdem stand der eindeutige Beweis für die Reduktion des Sulfits zu Schwefelwasserstoff noch aus.

War es möglich, den hypothetisch geforderten Schwefelwasserstoff abzufangen? Die ersten Versuche, die mit dem Ziel durchgeführt wurden, H_2S mit der Methylenblau-Methode zu erfassen und darauf einen enzymatischen Test aufzubauen, verliefen ergebnislos. Dennoch musste es möglich sein, Sulfit mit Hefepräparaten zu H_2S zu reduzieren, hatte doch Schlossmann bereits bei der Inkubation von Hefeextrakt mit ^{35}S -Sulfat radioaktiven Schwefelwasserstoff gefunden. Den ersten Hinweis für eine Sulfitreduktion durch einen Extrakt von zerschlagenen Hefezellen brachte die Inkubation mit ^{35}S -Sulfit in der Apparatur der Abb.2 . Die Versuche sind in der Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6

Nr.	ml Extrakt	uM G6P	uM TPN	CdS (IpM)
1	0.05	7	0.5	112
2	0.10	7	0.5	190
3	0.20	7	0.5	580
4	0.20	0	0	86

Die Ansätze enthielten ausserdem: 68600 IpM Radiosulfit; 0.05 ml einer mit H_2S gesättigten 0.1 NaOH 0.1 n Tris-Lösung (H_2S als Träger); Phosphat M/15 pH 8.3; Endyol.2.0 ml. Es wurde zwei Std. unter N_2 bei $37^\circ C$ inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Erhitzen wurde 50 Min N_2 durch die Apparatur geleitet, um H_2S vollständig in die Cd-acetat-Vorlage zu leiten. CdS wurde abfiltriert und auf dem Papier ausgezählt. Leerwert: 24.2 IpM.

Der Umsatz lag im besten Falle noch unter 1 Prozent. Der Versuch war wenig ermutigend. Die Ursache wurde erst später klar: Schwefelwasserstoff hemmt das Sulfit reduzierende System.

4. Kolorimetrische Erfassung von entstandenem Schwefelwasserstoff

Da die Erfolgsaussichten einer Enzymisolierung wesentlich von der Art des Enzymtests abhängen, ist man bestrebt, im Laufe einer Enzymanreicherung möglichst bald die meist umständliche Isotopenmethodik durch die schnellere kolorimetrischen oder optischen Testverfahren zu ersetzen. Bestand überhaupt eine Chance angesichts des geringen Umsatzes in den Versuchen der Tab.6, die Bildung von H_2S aus Sulfit mit der Methylenblaumethode zu erfassen? Zur Prüfung dieser Frage wurden Versuche an intakten Bäckerhefezellen angestellt, die in der Tab.7 zusammengefasst sind.

Tabelle 7

Nr.	S-Verbindg.	Inkubation	$\mu M H_2S$ gef.
1	--	155 Min anaerob	0.005
2	2.5 $\mu M S_2O_3^{=}$	150 " "	0.072
3	2.5 $\mu M S_2O_3^{=}$	150 " "	0.092
4	2.5 $\mu M SO_3^{=}$	240 " "	0.189
5	2.5 $\mu M SO_3^{=}$	360 " "	0.227
6	2.5 $\mu M SO_3^{=}$	240 aerob	0.092

Die Ansätze enthielten: 250 mg ungespreste Bäckerhefe (Oberkottzau); 0.25 ml 10 prozentige Glucoselsg.; M/10 Phosphatpuffer pH 7.0, Vol. der Ansätze 2.5 ml. Während der Inkubation bei 25°C perlte zur Entfernung des H_2S O_2 -freier Stickstoff bzw. Luft durch die Ansätze.

Gärende Hefezellen können demnach erhebliche Mengen Schwefelwasserstoff bilden. Auf Grund von Versuch 1 muss man annehmen, dass dieser aus dem zugesetzten Sulfit oder (Versuch 2) Thiosulfat stammt. Unter aeroben Bedingungen beträgt der Umsatz nur mehr 58% der anaeroben Reduktion, wie ein Vergleich zwischen den Versuchen 4 und 6 lehrt.

Auch gefriereraufgeschlossene Hefezellen können Sulfit zu H_2S reduzieren. Wurden diese Zellen durch mehrmaliges Auswaschen an Substraten und Cofermenten verarmt, so besaßen sie nur mehr 63% der ursprünglichen Aktivität. Ein Zusatz von Hefekochsaft stellte die volle Aktivität wieder her. Die Versuche mit gefriereraufgeschlossenen Hefezellen sind in der nachstehenden Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8

Nr.	mg Hefe	Vorbehandlung	$\mu M SO_3^{=}$	Redukt.M u.Zusätze	Min. inkubiert	H_2S gef.
1	200	keine	2.5	25 mg Glucose	140	0.144
2	200	keine	0	25 mg Glucose	140	0.015
3	500	keine	2.5	25 mg Glucose	120	0.161
4	500	verarmt	2.5	25 mg Glucose	120	0.091
5	500	verarmt	2.5	25 mg Glucose + 0.20 ml Hefe- kochsaft	120	0.160
6	500	verarmt	2.5	0.05 ml Äthanol + 2 μM DPN	120	0.188

Das Volumen der Ansätze wurde mit M/10 Phosphatpuffer pH 7.0 auf 2.5 ml ergänzt. Es wurde im Thermostaten bei 25°C unter Durchleiten von N_2 inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Verbindung zur Zn-Acetat-Vorlage unterbrochen und H_2S wie üblich bestimmt.

Der Versuch Nr.6 in Tabelle 8 scheint den Ergebnissen älterer Experimente zu widersprechen. Diesen zufolge konnte nur mit TPN und G-6-P, nicht jedoch mit der Kombination DPN und Äthanol ein Einbau von Sulfit-Schwefel in Cystein erzielt werden. Die Frage, ob DPN oder TPN das Coferment der Sulfitreduktase ist, konnte erst später mit einem wenig gereinigten zellfreien Präparat zugunsten von TPN entschieden werden.

5. Sulfitreduktion durch zellfreie Hefepräparate

Die Methylenblau-Methode war demnach empfindlich genug, um in intakten und in gefrieraufgeschlossenen Hefezellen die Reduktion des Sulfits zu Schwefelwasserstoff zu erfassen. War es möglich, das Enzymsystem auch in zellfreien Hefeextrakten nachzuweisen? - eine unumgängliche Voraussetzung für die Reinigung des Enzyms. Während aber die üblichen Verfahren zur Darstellung zellfreier Extrakte, wie Toluol-Aufschluss oder Extraktion von getrockneter Hefe, völlig versagten, konnte durch Zerschlagen von Hefe mit Glasperlen in der Schüttelmaschine ein aktiver zellfreier Extrakt gewonnen werden. In den Abb.40 und Abb.41 erkennt man die lineare Enzym- und Zeitabhängigkeit der Bildung von H_2S aus Sulfit.

Dieser rohe Extrakt verliert jedoch sehr schnell seine Sulfit reduzierende Fähigkeit. Die Aktivität lässt sich nicht über Nacht bei $0^{\circ}C$ aufbewahren, sondern geht vollständig verloren. Auch in eingefrorenem Zustand beträgt die Einbusse über 50 Prozent.

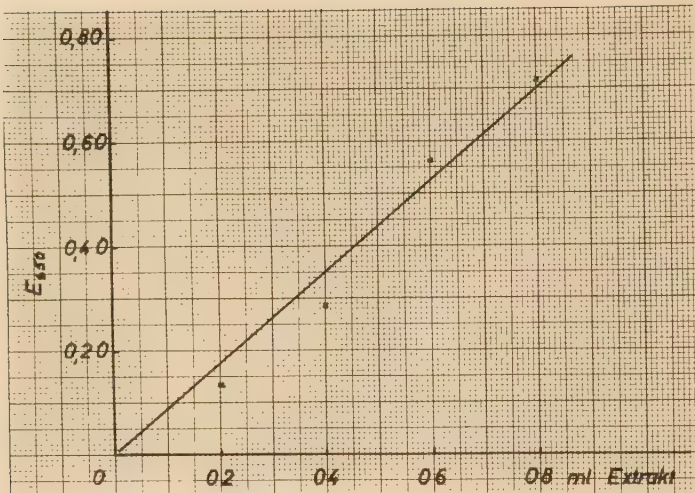


Abb.40

Enzymabhängigkeit des Hefe-Zerschlagungsextraktes. Die Ansätze enthielten: 25 mg Glucose; 2.5 μM SO_3^{2-} ; M/10 Phosphatpuffer pH 7.0; Endvol. 2.0 ml. 60 Min bei 25°C inkubiert.

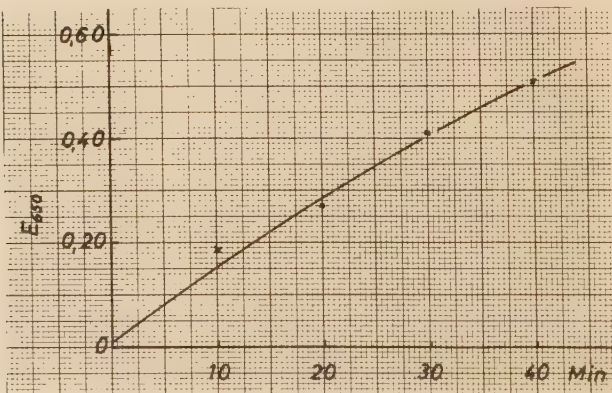


Abb.41

Zeitabhängigkeit der H_2S -Bildung aus Sulfid durch Hefe-Zerschlagungsextrakt. Die Ansätze enthielten 1.00 ml Zerschlagungsextrakt, Substrate und Puffer wie in Abb. 40. Temp. 25°C. Stop durch 0.25 ml 3 M Trichloressigsäure.

6. Definition der Enzymeinheit

Bevor eine Reinigung des Enzyms in Angriff genommen wurde, schien es zweckmässig, die Inkubationsbedingungen festzulegen und eine Einheit des Enzyms zu definieren. Die Ansätze enthielten bei einem Endvolumen von 2 ml M/10 Phosphatpuffer pH 7.0; 46 μM Glucose-6-phosphat; 420 TPN (Boehringer) und 2.5 μM Na_2SO_3 . Vor dem Einführen von Sulfit wurde 10 Minuten ein kräftiger Strom von O_2 -freiem Stickstoff durch das Inkubationsgefäss geleitet (Abb.2, Seite 11). Das Spülen mit Stickstoff wurde nach Zugabe von Sulfit weitere 5 Minuten fortgesetzt, dann wurde mit Enzym gestartet. Unter mässigem Durchperlen von Stickstoff-Schaumbildung verhinderte eine Spur n-Octanol- wurde 40 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach dieser Zeit unterbrach ein Zusatz von 0.2 ml 30 prozentige Metaphosphorsäure die Reaktion. Um Schwefelwasserstoff quantitativ in die Vorlage mit 3.0 ml Zinkacetat-Lösung zu überführen, wurde noch weitere 15 Minuten ein kräftiger Stickstoffstrom durch das Inkubationsgefäss geleitet. In der Vorlage wurde schliesslich vorhandenes Sulfid mit 1.0 ml Dimethyl-p-phenylen-diamin- und 0.1 ml Eisen-III-ammoniumsulfat-Lösung zu Methylenblau umgesetzt. Nach 5 Minuten wurde die Extinktion bei 650 μm gegen Wasser gemessen.

Unter diesen Bedingungen setzt eine Enzymeinheit (Einh.) in einer Minute 0.02 μM Sulfit zu Schwefelwasserstoff um, so dass in der Vorlage die Extinktion bei 650 μm gegen Wasser gemessen, 0.100 beträgt. Bei einer Inkubationsdauer von 40 Minuten erhält man somit die Anzahl der eingesetzten Einheiten durch Division der gefundenen E_{650} -Werte durch 40. Die spezifische Aktivität wird ausgedrückt in Einh/mg Protein, wobei Protein mit Biuret-Reagenz bestimmt wird.

7. Vorläufige Anreicherung der Sulfitreduktase

Durch das Zerschlagen der Hefe mit Glasperlen gewinnt man eine trübe, konzentrierte Proteinlösung (ca. 100 mg/ml Protein), die selbst in der Ultrazentrifuge nicht klar zu bekommen ist. In diesem rohen Extrakt sind neben Zelltrümmern noch Zellpartikel suspendiert, welche den Mitochondrien und Mikrosomen der tierischen Zelle entsprechen. Diese werden durch Protaminsulfat-Lösung ausgefällt und abzentrifugiert. Dabei entfernt man auch eine erhebliche Menge der Nucleinsäuren, die bei allen Verfahren der Proteinfractionierung stören. Der Überstand der Protaminsulfatfällung enthält das Sulfitreduzierende Enzym in 80 - 110 (!) prozentiger Ausbeute bei einer Verbesserung der spezifischen Aktivität um das fünffache. Damit ist zugleich gezeigt, dass die Sulfitreduktase zu den Enzymen des Zellplasmas gehört und nicht an Partikel gebunden ist. Mit dem Überstand der Protaminsulfatfällung wurde eine Enzymabhängigkeit aufgenommen, welche über einen weiten Bereich linear verläuft (Abb.42). Ein Vergleich zwischen den reduzierenden

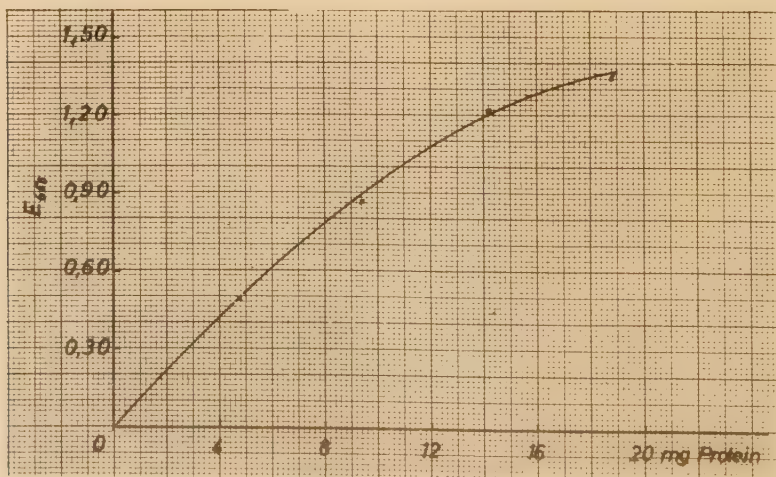


Abb.42

Enzymabhängigkeit der Sulfitreduktion durch den Überstand der Protaminsulfatfällung. Die Ansätze enthielten: 46 μ M G-6-P; 420 μ M TPN; 2.5 μ M SO_3^{2-} ; Phosphatpuffer pH 7.0; 4.7 - 18.8 mg Protein. Endvol. 2.0 ml. Inkubation: 40 Min. bei 30°C. Stop mit 0.25 ml 30 prozentiger Metaphosphorsäure.

Substraten Glucose, Äthanol-DPN und G-6-P-TPN (Tabelle 9) fällt eindeutig zugunsten der letzteren Kombination aus. Dass TPNH der Wasserstoffdonator der biologischen Sulfitreduktion ist, wird an späterer Stelle noch weiter erhärtet werden.

Tabelle 9

Nr.	ml Enzym	$\mu\text{M SO}_3^{=}$	Reduzierendes Substrat	$\mu\text{M H}_2\text{S}$ gef.
1	1.0	2.5	25 mg Glucose	0.036
2	1.0	2.5	0.05 ml Äthanol; 1.0 μM DPN	0.032
3	1.0	2.5	14 μM G-6-P; 0.5 μM TPN	0.096

Aus dem Überstand der Protaminsulfatfällung konnte das Enzym durch Fraktionierung mit Ammoniumsulfat weiter angereichert werden. Zwischen 50 und 56 Prozent Sättigung wurden 41 Prozent der Aktivität wiedergefunden. Die spezifische Aktivität war um das vierfache gestiegen.

8. Der optische Test der Sulfitreduktase

Nach der Ammonsulfatfraktionierung war die Sulfitreduktase etwa 20 fach angereichert. Nun erhob sich die Frage, ob man die Übertragung des Wasserstoffs vom TPNH auf das Sulfit auch optisch bei 340 μm , der Bande des reduzierten Pyridinnucleotids, verfolgen könnte. Aus der Menge des mit der Methylenblau-methode ermittelten Schwefelwasserstoffs musste man das erwarten, zumal pro Mol entstandenen H_2S drei Mol TPNH verschwinden mussten. In Abb.43 (siehe nächste Seite) wurde die Abnahme von TPNH bei 340 μm verfolgt. Der flache Ast der beiden Kurven ist auf die Wirkung einer TPNH-Oxydase zurückzuführen. Nach Zusatz von Sulfit jedoch nimmt die Neigung der Kurven

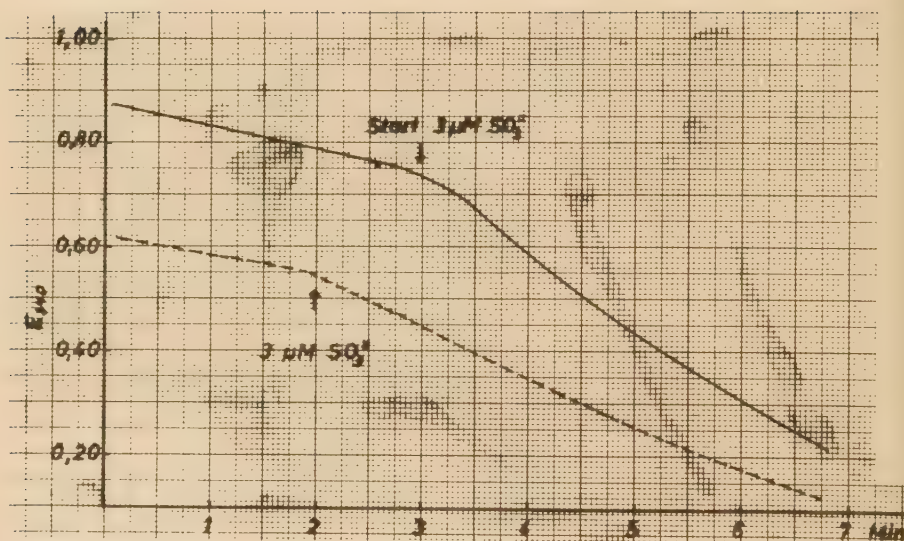


Abb. 43

Verfolgung der enzymatischen TPNH-Oxydation bei 340 mμ (Beckmann, Mod. DU). Kurve 1: 5.24 mg Protein; Kurve 2: 10.5 mg Protein. TPNH Lösung und Phosphatpuffer pH 7.0 ergänzten das Volumen auf 2.33 ml. Flacher Ast = Kinetik der TPNH-Oxydase. Nach Start mit 0.025 ml/M/10 Na₂SO₃ Beginn der Sulfitreduktion = steiler Ast.

um das vierfache zu. Man ermittelt die wahre Aktivität der Sulfitreduktase, indem man von der Neigung des zweiten Kurvenastes die des ersten substrahiert. Das macht rund 25 Prozent der Gesamtneigung aus. Man kann aber auch die TPNH-Oxydase eliminieren, indem man gegen eine Kuvette misst, die sich von der ersten nur durch das Fehlen von Sulfit unterscheidet. Bedient man sich dabei eines automatischen, selbstschreibenden Spektralphotometers, z.B. des Gerätes DK 1 von Beckmann, so erhält man sogleich die wahre Reaktionsgeschwindigkeit der Sulfitreduktase, die in Abb.44 für verschiedene

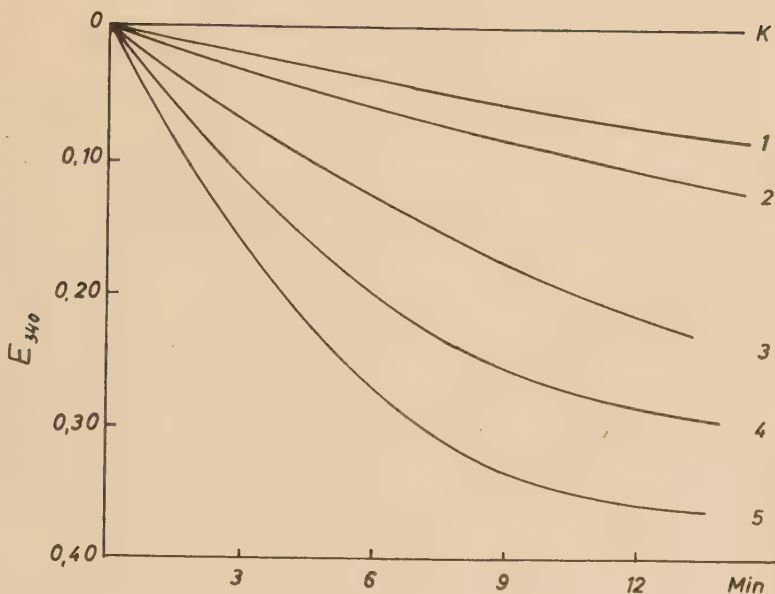


Abb.44

Optischer Test der Sulfitreduktase.

In 1 cm-Quarzkuvetten wurde eingeführt: 0.36 μM TPNH; 2.5 μM Na_2SO_3 ; 1.2 - 12 mg Protein, M/10 K-Phosphatpuffer pH 7.0 zum Endvolumen 2.6 ml. Die relative Abnahme der Extinktion bei 340 m μ wurde im Spektralphotometer Beckmann Modell DK 1 gegen eine sulfitfreie, im übrigen genau gleiche Kuvette verfolgt.

1) 1.21; 2) 2.01; 3) 4.02; 4) 8.05; 5) 12.1 mg Protein.

K: Kontrolle ohne Sulfit.

Enzymkonzentrationen gemessen wurde. Das Gerät vergleicht die beiden Kinetiken: TPNH-Oxydase und TPNH-Oxydase plus Sulfitreduktase und subtrahiert die erstere von der letzteren. Bei dieser Versuchsanordnung kann das Gerät jedoch nur die relative Zunahme der optischen Dichte registrieren. Die Kurven geben daher die scheinbare Zunahme der Extinktion bei 340 m μ in der sulfitfreien Kuvette wieder. Die Nullpunktsneigung

der Kurven ist ein unmittelbares Mass der Sulfitreduktase-aktivität. Trägt man diese gegen die eingesetzte Menge Enzym auf, so erhält man die Enzymabhängigkeit der Abb.45.

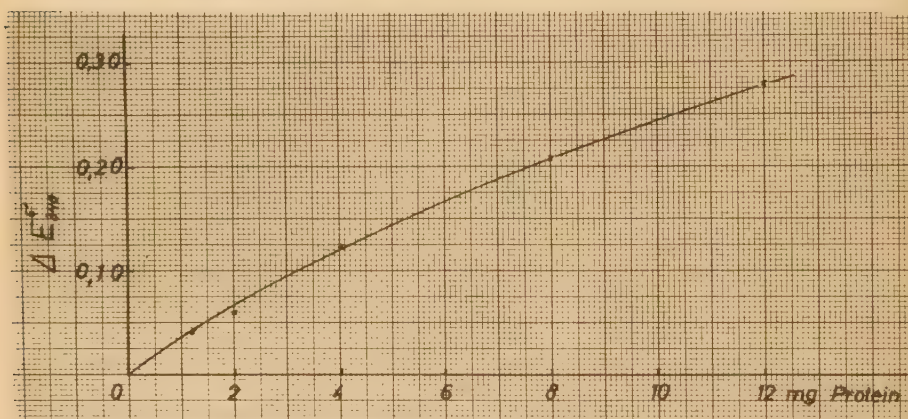


Abb.45

Enzymabhängigkeit der Sulfitreduktion im optischen Test. Abzisse: mg Protein; Ordinate: relativer Abfall der Extinktion zwischen 0 und 6 Minuten. Zusammensetzung der Küvetten s. Abb.44.

Bei einer weiteren Anreicherung des Enzyms wird man dem optischen Test der Sulfitreduktase vor dem H_2S -Test (Methylenblaumethode) den Vorzug geben.

9. Alkalischer Toluolaufschluss und Butanolaufschluss nach Morton

Zur Anreicherung des Enzyms aus dem rohen Zerschlagungs-extrakt ging man von 15 bis 30 g Bäckerhefe aus. Der Rohextrakt besass eine spezifische Aktivität von $0.449 \cdot 10^{-3}$. Nach Protaminsulfatfällung und Ammoniumsulfatfraktionierung war die spezifische Aktivität auf $9.8 \cdot 10^{-3}$ gestiegen. (Näheres darüber

im experimentellen Teil). Die Aufarbeitung grösserer Ansätze nach diesem Verfahren unterblieb aus folgenden Gründen: In der Zerschlagungsmaschine können höchstens 20 g Ausgangsmaterial in einer Beschickung verarbeitet werden. Für eine weitere Anreicherung des Enzyms hätte man mindestens von einem halben kg Bäckerhefe ausgehen müssen. Der Rohextrakt sollte tunlichst sofort weiter verarbeitet werden. Bei der Aufarbeitung grösserer Ansätze war daher mit einer beträchtlichen Einbusse an Aktivität zu rechnen. Ausserdem gestaltet sich die Protaminsulfatfällung, welche für die scharfe Fraktionierung mit Ammoniumsulfat unumgänglich ist, bei grösseren Ansätzen sehr kostspielig. Daher schien es geraten, nach anderen Aufschlussmethoden Umschau zu halten. Über diese Versuche wird im folgenden berichtet.

Die übliche und oft erprobte Autolyse der Bäckerhefe mit Toluol brachte nur Spuren von Sulfitreduktase in Lösung. Dieses Verfahren überstehen jedoch nur säureempfindliche Enzyme, da während des Aufschlusses das pH des Mediums unter 4.5 sinkt. Auf diesen Umstand weist Lorch²²⁾ bei der Reinigung der Serinsulfhydrase hin. Auch dieses Enzym überdauert den sauren Aufschluss nicht. Sorgt man jedoch durch einen grossen Überschuss von Toluol für eine schnelle Verflüssigung der Hefe und hält anschliessend ein neutrales bis schwach alkalisches Milieu aufrecht, so erhält man das Enzym in Lösung. Dieselbe Erfahrung machten wir auch bei der Sulfitreduktase. Die folgende Tabelle 10 (siehe nächste Seite) gibt einen Überblick über die durchgeführten Aufschlüsse.

Obgleich die Resultate schwanken, kann man die Überlegenheit der Autolyse zwischen pH 9 und 9.5 erkennen. Die spezifische Aktivität des Autolysats nach Abzentrifugieren der Zellrückstände liegt zwischen der des rohen Zerschlagungsextraktes ($0.45 \cdot 10^{-3}$) und des Präparates nach der Protaminsulfatfällung ($2.2 - 2.6 \cdot 10^{-3}$).

Versuche, die Sulfitreduktase aus getrockneter Hefe zu extrahieren, führte zu ähnlichen Ergebnissen. Inkubierte man

Tabelle 10

Nr.	Herkunft der Hefe	pH d.Aufschl.	Protein mg/ml	spez. Aktivität $\cdot 10^3$
1	Oberkottzau	6.0 - 4.5	5.3	0.235
2	Oberkottzau	8.6 - 8.8	31.8	0.55
3	Hameln	8.3 - 8.5	25.1	0.549
4	Oberkottzau	8.6 - 8.8	23.5	0.826
5	Hameln	8.6	27.6	0.884
6	Gigold	8.6	31.9	0.618
7	Hameln	8.8 - 9.0	24.7	1.32
8	Oberkottzau	8.8 - 9.2	24.4	1.28
9	Hameln	9.3 - 9.5	22.5	1.69
10	Hameln	9.1 - 9.3	19.6	0.88
11	Hameln	9.4	16.8	1.28
12	Bierhefe (Löwenbräu)	8.0 - 8.5	13.3	keine Aktiv.

das Trockenpräparat mit der dreifachen Menge M/15 sec. Natriumphosphat bei 37°C, so fiel infolge der einsetzenden Gärung innerhalb von 90 Min das pH auf 5.8 ab, und Sulfitreduktase ging nicht in Lösung. Hielt man dagegen während der Extraktion ein alkalisches Milieu aufrecht, so ging nur verschwindend wenig Protein in Lösung, dieses aber von relativ hoher spezifischer Aktivität ($1.4 - 2,8 \cdot 10^{-3}$ Einh/mg). Wegen der zu geringen Ausbeute brachte aber dieser Aufschluss keinen Vorteil.

Zum Aufschluss von Zellen und Zellpartikeln führte Morton⁶¹⁾ mit Erfolg die Extraktion mit n-Butanol ein. Auf diese Weise konnte er die Ausbeute an Milchsäuredehydrogenase (Cytochrom b_2) aus getrockneter Bäckerhefe erheblich verbessern. Auch diese Möglichkeit wurde untersucht. Die Behandlung von getrockneter oder frischer Bäckerhefe mit n-Butanol sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 0°C führte jedoch stets zum vollständigen Verlust der sulfitreduzierenden Fähigkeit. Lediglich lyophilisier-

te Bäckerhefe behielt nach Extraktion mit n-Butanol bei -10°C 50 Prozent ihrer ursprünglichen Aktivität. Um sicher zu gehen, dass nicht mit dem Butanol ein notwendiger Cofaktor den Zellen entzogen wurde, zog man nach der Extraktion dieses organische Lösungsmittel im Vakuum ab. Der übelriechende Rückstand wurde in destilliertem Wasser suspendiert. Jedoch vermochte dieser, wie auch ein Zusatz von Hefekochsaft, die Aktivität der n-Butanol extrahierten Präparate nicht wieder herzustellen.

10. Vorversuche zur weiteren Anreicherung des Enzyms

Wollte man nicht zum Zerschlagungsextrakt zurückkehren, so schien die Autolyse mit Toluol die meisten Aussichten für eine Anreicherung des Enzyms in grösserem Masstab zu bieten. Die Versuche, über die in diesem Abschnitt berichtet wird, hatten informatorischen Charakter und sollten Auskunft über Instabilität oder Resistenz des Enzyms gegenüber verschiedenen Einwirkungen geben.

a) Säurefällung: Beim Ansäuern des alkalischen Überstandes des Toluolaufschlusses mit n Essigsäure auf pH 6.0 fällt kaum Protein aus. 48 Prozent der Aktivität geht jedoch verloren. Nach weiterem Ansäuern auf pH 5.5 und 5.0 findet man im Überstand nur noch 30 bzw. 14 Prozent der ursprünglichen Aktivität. Auch im Niederschlag findet sich kaum Aktivität.

b) Acetonfällung: Bei dem Versuch einer Acetonfraktionierung des Toluolaufschlusses ging trotz schonender Bedingungen die gesamte Aktivität verloren. Dieser Versuch verstärkt den bei der n-Butanol-Extraktion gewonnenen Eindruck einer hohen Empfindlichkeit der Sulfitreduktase gegenüber organischen Lösungsmitteln. Daher wurden weitere Experimente in dieser Richtung unterlassen.

c) Dialyse: Im Hinblick auf einen eventuellen Gelschritt wurde die Stabilität der Sulfitreduktase gegenüber der Dialyse untersucht. Dialysiert man den Toluol-Aufschluss eine Stunde gegen M/500 Trispuffer pH 8.9 bei 0°C, so geht rund 50 Prozent der Aktivität verloren. Steht dasselbe Präparat dagegen eine Stunde bei 0°C, so beträgt der Verlust nur 3 Prozent. Ein Zusatz von Hefekochsaft kann die Aktivität nicht restaurieren. Auch die aktive Ammonsulfatfraktion des Zerschlagungs-extraktes besass nach einstündiger Dialyse gegen M/500 Trispuffer pH 8.9 nur noch 41 Prozent der ursprünglichen Aktivität. Wurde dieses Präparat jedoch eine Stunde gegen eine zu 30% gesättigte Ammoniumsulfatlösung (pH 7.5) dialysiert, so blieb 90 Prozent der Aktivität erhalten. Die Verluste bei der Dialyse gehen wahrscheinlich auf eine Denaturierung des Enzyms in salzfreier Lösung zurück und rühren wohl kaum von der Entfernung eines Kofaktors her, da man in diesem Falle eine Wiederherstellung der Aktivität auf einen Zusatz von Hefekochsaft oder eingengtem Diffusat erwarten müsste.

d) Hitzebeständigkeit: Hält man den Überstand des Toluol-Aufschlusses 5 Minuten bei 50°C, so fällt etwa 30 Prozent des Proteins aus. Der Überstand enthält danach nur noch 28 Prozent der ursprünglichen Aktivität. Auch die spezifische Aktivität sinkt über die Hälfte ab. Eine durch Ammoniumsulfatfällung zwischen 45 und 50 Prozent Sättigung gewonnene Fraktion des Toluol-Aufschlusses (spez. Aktivität $3.14 \cdot 10^{-3}$) büsste bei der gleichen Behandlung ihre Aktivität fast vollständig ein. Wurde der Hitzeschritt dagegen in M/500 Sulfitlösung durchgeführt, so blieb 76 Prozent der Aktivität erhalten. Die spezifische Aktivität stieg auf $3.94 \cdot 10^{-3}$. Die Sulfitreduktase zeigt hier ein ähnliches Verhalten wie die Hefe-Milchsäurehydrogenase: In Gegenwart des Substrates hält das Enzym noch Temperaturen aus, bei denen es ohne diese Schutzwirkung vollständig inaktiviert wird. Aber abgesehen von dem geringen Reinigungseffekt scheint mir nach der Ammoniumsulfatfällung der Hitzeschritt nicht mehr angebracht. Denn durch den Zusatz von Sul-

fit verliert man die Kontrolle über den optischen Test.

11. Versuche zur Charakterisierung des Enzyms

In diesem Abschnitt werden einige Versuche zusammengefasst, welche zur weiteren Charakterisierung des Sulfit-reduzierenden Enzyms durchgeführt wurden.

Im optischen Test zeigte sich kein Unterschied zwischen den Phosphatpuffern pH 7.0 und 7.5. Dagegen besass das Enzym im Phosphatpuffer pH 6.5 nurmehr 80 Prozent Aktivität.

Setzt man statt Sulfit Natriumthiosulfat oder kolloiden Schwefel ein, so findet man keinen Lauf der TPNH-Oxydation. Die Sulfitreduktase reduziert Thiosulfat oder kolloiden Schwefel nicht.

Um zu sehen, ob das Enzym essentielle SH-Gruppen enthält, wurde im optischen Test Jodacetamid zugesetzt. Das Ergebnis verblüffte: Anstatt zu hemmen stimuliert dieses Reagenz die enzymatische Reduktion des Sulfits. Misst man über einen Zeitraum von 6 Minuten so erhöht sich der Umsatz bei einer Konzentration von M/5000 und M/1000 Jodacetamid um 11 bzw. 50 Prozent. Wahrscheinlich hebt dieses SH-Reagenz eine Hemmung des Enzyms durch das Endprodukt Schwefelwasserstoff auf, indem es diesen als Thioglycolsäureamid bindet. Eine eindeutige Hemmung der Sulfitreduktase konnte nur mit Cyanid und Hydroxylamin festgestellt werden (Abb.46 siehe nächste Seite).

M/1000 KCN hemmt bereits $1/3$ der Aktivität, während man bei M/100 nur noch 13 Prozent der ursprünglichen Aktivität findet. Hydroxylamin hemmt die Sulfitreduktase in der Konzentration von M/500 zu zwei dritteln. Dagegen wurde das Enzym durch M/100 Semicarbazid nicht vergiftet. Auch der Schwermetallkomplexbildner $2,2'$ -Dipyridyl beeinträchtigt in der Konzentration M/500 die Aktivität nicht.

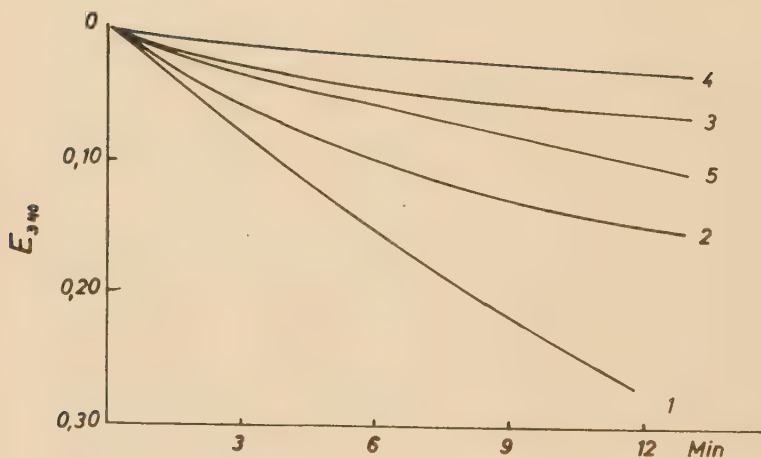


Abb.46

Hemmung der enzymatischen Sulfitreduktion durch Cyanid und Hydroxylamin. Füllung der Kuvetten: 0.5 ml 0.5 M K-Phosphatpuffer pH 7.0; 0.02 ml TPNH-Lösung (37 $\mu\text{M}/\text{ml}$); 0.05 ml aktive Ammonsulfatfraktion; berechnete Menge K-Cyanid bzw. Hydroxylamin-HCl-Lösung; in der Reaktionskuvette 2.5 μM Na_2SO_3 .

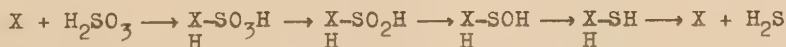
1) ohne Cyanid und Hydroxylamin; 2) M/1000 KCN; 3) M/500 KCN; 4) M/100 KCN; 5) M/500 NH_2OH .

III. Diskussion der Ergebnisse

1. Zum enzymatischen Mechanismus der Sulfitreduktion

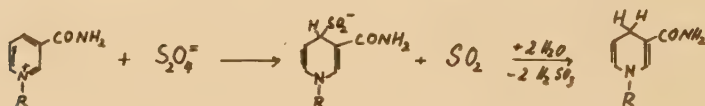
Die Versuche mit Sulfitreduktase beweisen eindeutig, dass die biologische Reduktion des Sulfits nicht über Thiosulfat verläuft. Das Sulfit reduzierende System reduziert Thiosulfat nicht. Dieses Ergebnis stimmt mit Versuchen von Hilz⁸⁾ überein, welcher zeigen konnte, dass Thiosulfat nur die Bildung des "aktiven Sulfats" hemmt, aber auf die Reduktion zu Sulfit und Schwefelwasserstoff keinen Einfluss hat. Die zwischen Sulfit und Schwefelwasserstoff als Zwischenprodukte in Frage kommenden Säuren des Schwefels (Dithionit, H_2SO_2 oder H_2SO) sind sämtliche instabil und bilden sehr leicht durch Disproportionierung oder Oxydation Sulfit. Daher wäre es zwecklos, diese in enzymatischen Versuchen einsetzen zu wollen.

Denkbar ist jedoch, dass die Zwischenstufen der Reduktion nur am Enzym auftreten und nicht von diesem abdissoziieren. Die Reduktion würde sich dann stufenweise an der prosthetischen Gruppe X des Enzyms abspielen:



Hinweise bezüglich der prosthetischen Gruppe geben die Hemmungsversuche. Cyanid, Hydroxylamin und Schwefelwasserstoff sind starke Inhibitoren. Man könnte daher versucht sein, eine Keto- oder Aldehydverbindung (z.B. Pyridoxalphosphat) als Ort der biochemischen Reaktion anzunehmen. Dagegen spricht jedoch, dass Semicarbazid keine hemmende Wirkung zeigt. Möglich wäre auch die Bindung des Sulfits an das Enzym durch eine Disulfidgruppe in der Art der Disulfidaufspaltung. Jedoch ist über eine Reaktion von Hydroxylamin mit Disulfiden nichts bekannt. Dagegen haben die drei genannten Hemmstoffe mit Sulfit die Bildung von Addukten mit Pyridinnucleotiden gemeinsam. Pfeleiderer⁶²⁾

zeigte, dass die Hemmung der Muskel-Milchsäuredehydrogenase durch Sulfit auf der Bildung eines DPN-Sulfit-Komplexes beruht, der sich durch eine Absorptionsbande bei 320 mμ zu erkennen gibt. Kaplan und Ciotti⁶³⁾ machten mit Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase den DPN-Hydroxylamin-Komplex evident. San Pietro⁶⁴⁾ berichtet über die Struktur des DPN-Cyanid-Komplexes, und van Eys und Kaplan⁶⁵⁾ untersuchten die Addition von Sulfhydrylverbindungen mit DPN und seinen Analogen. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass nach Arbeiten von Westheimer⁶⁶⁾ auch die bekannte Hydrierung des Pyridinnucleotids mit Dithionit über ein Sulfoxysäureaddukt erfolgt, welches durch Wasser in DPNH und Sulfit gespalten wird:



2. Bedeutung und Mechanismus der Thiosulfatdesulphydrase

Welche Bedeutung der Thiosulfatdesulphydrase im Schwefelwasserstoffwechsel der Hefe zukommt, bleibt ungeklärt. Es wurde zwar gezeigt, daß die Hefe aus β -Mercaptobrenztraubensäure und Sulfit Thiosulfat bilden kann, aber es ist nicht einzusehen, warum der Schwefel den Weg über Thiosulfat nehmen soll, wenn die Zelle bereits über die β -Mercaptobrenztraubensäuredesulphydrase verfügt. Wahrscheinlich hat die Thiosulfatdesulphydrase der Hefe nichts mit der Assimilation des Schwefels zu tun, sondern ist ein Pendant zu einer Gruppe von de- und transsulfurierenden Enzymen, welche in der Leber von Säugetieren aufgefunden wurden. Zu diesen gehören die Rhodanese und die β -Mercaptopyruvat-Sulfit-Transsulfurase. Beide Enzyme wurden von Sörbo^(loc.cit.) isoliert und untersucht. Fiedler und Wood⁶⁷⁾⁶⁸⁾ sowie Kun und Fanshier⁶⁹⁾ betonen dagegen die direkte enzymatische Übertragung des Schwefels von β -Mercaptobrenztraubensäure auf Cyanid. Den Mechanismus dieser Übertragungsreaktion diskutieren Hylin und Wood⁷⁰⁾.

Danach nimmt die prosthetische Gruppe des Enzyms, die ein Disulfid-Kupfer-Komplex sein soll, den Schwefel von der β -Mercaptobrenztraubensäure auf. An den Komplex gebunden, liegt der Schwefel in einer "aktiven" Form vor, aus der er in verschiedenen Richtungen reagieren kann z.B. mit Cyanid unter Bildung von Rhodanid oder mit zwei Molekeln Glutathion, wobei Schwefelwasserstoff entsteht. Für die Rhodanese schlug Sörbo (loc.cit.) schon früher einen ähnlichen Reaktionsmechanismus vor (vgl. S. 34). Auch für das Hefeenzym besteht die Formulierung eines am Enzym gebundenen "aktiven" Schwefels, welcher wahlweise zu Rhodanid oder H_2S weiterreagieren könnte. Das setzt jedoch eine Identität der Heferhodanese und Thiosulfatdesulphydrase voraus. Diese Frage aber musste offen gelassen werden.

Als die vorliegende Arbeit über die Thiosulfatdesulphydrase im wesentlichen abgeschlossen war, erschien eine Veröffentlichung von Kaji und McElroy⁷¹⁾ über den Mechanismus der Schwefelwasserstoffbildung aus Thiosulfat. Die Verfasser verwendeten ein wenig gereinigtes Präparat aus Trockenhefe. Ihre Ansätze enthielten 1 - 12 mg Protein, während in den vorstehend beschriebenen Versuchen zwischen 0.6 - 20⁷ Protein je Versuch eingesetzt wurde.

Ishimoto und Mitarbeiter⁷²⁾⁷³⁾ isolierten aus Extrakten von *Desulfovibrio desulfuricans* ein Thiosulfat reduzierendes System. Das System besteht aus einer Hydrogenase, die Wasserstoff über einen Zwischenträger auf das Thiosulfat reduzierende Enzym überträgt. Als Zwischenträger kann Methylviologen dienen. Über eine Hemmung durch Sulfit wird nichts berichtet. Es ist möglich, dass die Thiosulfatreduktion in diesem Microorganismus einem anderen Mechanismus folgt.

C. Beschreibung der Versuche

I. Hilfsenzyme und Substrate

1) Aldehyddehydrogenase und TPNH

In den optischen Testverfahren der Enzyme Thiosulfatdesulfhydrase und Sulfitreduktase musste sulfitfreies TPNH eingesetzt werden. Denn die Thiosulfatdesulfhydrase wird durch Sulfid gehemmt und im optischen Test der Sulfitreduktase wird die enzymatische Oxydation des TPNH mit und ohne Sulfid verglichen, Sulfidfreies TPNH lässt sich nur auf enzymatischem Wege gewinnen. Die Reduktion durch das Aldehyddehydrogenasesystem wurde gewählt, weil sich das Substrat Acetaldehyd leicht im Vakuum entfernen lässt. Das Enzym wurde aus Bäckerhefe nach Seegmiller⁸¹⁾ angereichert. Die Ansätze zur Reduktion von TPN enthielten:

10 - 30	mg TPN (Boehringer) in 1 ml Wasser gelöst
0.15	ml M/10 MgSO_4
0.10	ml M NaHCO_3
0.30	ml M/5 Acetaldehydlösung in Wasser.

Mit 1.5 M Sodalösung wurde das pH auf 8.0 eingestellt und mit etwa 5 mg Enzym die Reaktion gestartet. Der Verlauf der Reduktion wurde durch Entnahme von Proben und Messen der Absorption bei 340 mμ verfolgt. Durch den Verbrauch von TPN verlangsamte sich die Reduktion und kam nach etwa 90 Min. zum Stillstand. Von der Vollständigkeit der Reduktion überzeugte man sich durch einen Zusatz von Zwischenferment und G-6-P. Es wurde stets nur ein geringer zusätzlicher Lauf (ca. 5%) festgestellt. Die Reaktion wurde mit 0.2 ml 2 n KOH unterbrochen und 10 Minuten stehen gelassen. Dann wurde die Lösung mit 2 n H_2SO_4 auf pH 8.9 gebracht, eingefroren und im Exsikkator am Hochvakuum über CaCl_2 eingedampft. Das Trockenpulver wurde in 1-2 ml

Wasser gelöst und war nach Abzentrifugieren trübender Rückstände gebrauchsfertig.

2) Glutathionreduktase:

Zur Reinigung dieses Enzyms aus Bäckerhefe (Gigold) wurde die Vorschrift von Racker⁸²⁾ geringfügig modifiziert. Statt einer Extraktion von Trockenhefe wurde frische Hefe mit Toluol aufgeschlossen. Der Hitzeschritt unterblieb. Acetonfällung und alle weiteren Anreicherungsstufen folgten der Vorschrift.

3) Cysteinsulfonsäure wurde nach der Vorschrift von Micheel und Emde⁷⁴⁾ bereitet. Die Substanz fiel aus Äthanol nach Zusatz des vierfachen Volumens Äther in farblosen Nadeln aus. Die Kristalle hatten einen Schmelzpunkt F.P = 180 - 182°C. Die Substanz wanderte in der Hochspannungselektrophorese im Pyridin-Acetat-Puffer pH 6.5 einheitlich.

4) β -Mercaptobrenztraubensäure wurde nach Kun⁷⁵⁾ durch Umsetzung von β -Brombrenztraubensäure mit einem Überschuss von H₂S in 25%iger Ammoniaklösung dargestellt. Das Ammoniumsalz der Säure wurde in 55%iger Ausbeute aus Alkohol kristallisiert. Es schmolz bei 186 - 188°C unter Zersetzung. Das 2.4 Dinitrophenylhydrazon der Säure zeigte nach Umkristallisieren aus Chloroform-Petroläther den in der Literatur angegebenen Schmelzpunkt von 164 - 166°C. Das Ausgangsmaterial β -Brombrenztraubensäure wurde nach Sprinson und Chargaff⁷⁶⁾ durch Bromierung von Brenztraubensäure gewonnen.

II. Quantitative Bestimmung von Reaktionsprodukten

1) Schwefelwasserstoff.

Zur quantitativen Bestimmung von H_2S wurde die Methode von Lorant⁷⁴⁾ und Reimann modifiziert. Sie besteht in der Umsetzung von H_2S mit Dimethyl-p-phenylendiamin zu Methylenblau, das im Photometer gemessen wird. I.K. Fogo und M. Popowsky⁷⁸⁾ untersuchten diese Methode eingehend. Eine Übersicht findet sich ferner bei D.F. Boltz⁷⁹⁾.

Reagenzien: Lösung A: 50 g Zn-Acetat, 10 g Na-Acetat, 50 mg NaCl in 1000 ml H_2O .

Lösung B: 250 mg DpD, 25 ml konz. H_2SO_4 in 100 ml Wasser.

Lösung C: 25 g $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 5 ml konz. H_2SO_4 in 200 ml Wasser.

Schwefelwasserstoff wurde im N_2 oder CO_2 -Strom in eine Vorlage mit 3.0 ml der Lösung A getrieben, wo er als ZnS gebunden wird. In die Vorlage wurden sodann 1.00 ml Lösung B und 0.10 ml Lösung gegeben und kräftig umgeschüttelt. Nach 10 Min. wurde die Extinktion bei 650 m μ gegen Wasser gemessen. Die Eichkurve wurde mit einer frisch bereiteten Lösung von analysenreinem $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$, deren Sulfidgehalt jodometrisch bestimmt wurde, erhalten. Mit dieser Methode konnten 0.02 - 0.35 μM Sulfid bestimmt werden.

2) Bestimmung von Sulfit nach Grant⁴⁵⁾.

Die Lösung des Farbreagens wurde nach Bedarf täglich frisch zubereitet:

117 .0 ml Wasser

5.5 ml konz. H_2SO_4

2.0 ml 3 prozentige alkoholische Fuchsinlösung

0.7 - 0.8 ml 40 prozentige Formaldehydlösung, bis die Lösung nur noch gerade schwach rosa gefärbt ist.

Die auf Sulfit zu untersuchende Lösung (ca. 2 ml) wurde mit 1.0 ml gesättigter HgCl_2 -Lösung versetzt und 3 Min. stehen gelassen. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und mit 1.0 ml Wasser nachgewaschen. Die Überstände wurden vereinigt und mit 4.0 ml Farbreagenz versetzt. Nach Auffüllen des Volumens auf 8.00 ml wurde bei 570 m μ die Extinktion gegen eine 1:2 verdünnte Lösung des Farbreagenz gemessen. Die Eichkurve wurde mit 50 μM Thiosulfat und 5 μM Cystein aufgenommen. Die Kurve verlief zwischen 0.02 und 0.25 μM Sulfit linear.

3) Die Bestimmung von oxydiertem Glutathion (GSSG) erfolgte mit Hilfe der Glutathionreduktase. 1 Mol GSSG oxydiert 1 Mol TPNH. Der Verbrauch von TPNH errechnet sich aus der Differenz der Extinktion bei 340 m μ vor Ablauf und nach Beendigung der Reaktion unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten von TPNH. Den Ansätzen, deren GSSG-Gehalt bestimmt werden sollte, wurden 1.00 ml entnommen und in eine 1 cm Kuvette überführt, in der sich 1.32 ml M/10 K-Phosphatpuffer pH 7.6, 0.2 ml 10prozentige Albuminlösung und eine entsprechende Menge TPNH befand. Vor dem Start mit Glutathionreduktase und nach Beendigung der Reaktion wurde die Extinktion bei 340 m μ gemessen und aus der Differenz der Gehalt an GSSG errechnet.

4) Zur Bestimmung von Thiosulfat wurde die Methode von Sörbo⁸⁰⁾ unverändert übernommen.

III. Messung von Enzymaktivitäten

1) Der Rhodanesetest:

In einem graduierten Reagenzglas werden 100 μM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 20 μM KCN, 2 μM Cystein, 1.7 ml M/20 Trispuffer pH 9.3 und Enzym mit H_2O auf 2.00 ml aufgefüllt und 30 Min. bei 37°C

inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wird die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 0.5 ml 35 prozentigen Formaldehyds unterbrochen. Gleich darauf wird mit 1.0 ml Eisennitratreagenz nach Sörbo ($100 \text{ g Fe(NO}_3)_3 \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$ und $200 \text{ ml 65\% HNO}_3$ in 1000 ml Wasser) der rote Eisenrhodanidkomplex entwickelt. Der Ansatz wird mit Wasser auf 5.00 ml aufgefüllt. Man misst die Extinktion bei $460 \text{ m}\mu$ gegen einen genau gleichen Ansatz ohne Enzym. Die Farbe des Eisenrhodanidkomplexes nimmt innerhalb von 20 Min nicht wesentlich ab. Die eingesetzte Aktivität wird ausgedrückt durch die unter diesen Inkubationsbedingungen gefundene Extinktion bei $460 \text{ m}\mu$. Die spezifische Aktivität wurde bereits auf S. 49 definiert.

2) Der optische Test der Thiosulfatdesulphydrase

In eine 10 mm Glaskuvette werden folgende Substanzen einpipettiert: 0.100 ml 1 prozentige Albuminlösung, 0.050 ml M/10 K-Trilonat, $0.015 \text{ ml TPNH-Lösung}$ (13 uM/ml), 0.025 ml M/10 GSH-Lösung, $0.025 \text{ ml M/1 Na-Thiosulfatlösung}$, $0.020 \text{ ml GSSG-Reduktase}$, auf ein Endvol. von 1.00 ml berechnete Menge M/10 Phosphatpuffer pH 7.6 . Die Messung erfolgt in thermokonstanten Kuvetten bei einer Temperatur von 23.5°C . Man misst zunächst den Leerlauf der TPNH-Oxydation bei $366 \text{ m}\mu$ im Photometer "Eppendorf" ohne Thiosulfatdesulphydrase. Sobald der Leerlauf eine konstante Geschwindigkeit angenommen hat, startet man mit Enzym. Darauf misst man weiter in Abständen von 30 sec. die Abnahme der Extinktion bei $366 \text{ m}\mu$. Man subtrahiert von dem gesamten Abfall der Extinktion zwischen 0 und 5 Min. nach dem Start mit Enzym den aus dem Vorlauf ohne Enzym ermittelten Leerwert und erhält damit ein Mass der Aktivität.

3) Der optische Test der Sulfitreduktase

Zwei 10 mm Quarzkuvetten enthalten in einem Volumen von 2.60 ml M/10 Phosphatpuffer pH 7.0 , je 0.36 uM TPNH und die gleiche Menge Sulfitreduktase in jeder Kuvette. Werden nun die beiden Proben im automatischen Spektralphotometer Beckmann

DK.1 miteinander verglichen, so ist nach aussen kein Lauf zu erkennen, da die TPNH-Oxydation in beiden Kuvetten parallel läuft. Nun setzt man der einen Kuvette 2.5 μ M Sulfit zu und misst die zusätzliche TPNH-Oxydation durch Sulfitreduktase. Der automatisch registrierte Abfall der Extinktion bei 340 m μ ist ein Mass für die eingesetzte Aktivität. Der H₂S-Test der Sulfitreduktase wurde bereits auf S. bei der Definition der Enzymeinheit eingehend beschrieben.

IV. Darstellung der Enzympräparate

1) Gefrieraufschluss von Bäckerhefe:

10 g ungespreste Bäckerhefe werden in einer Porzellanschale mit flüssiger Luft gerade überdeckt. Nach 1 Minute wird der Überschuss an flüssiger Luft abgegossen und die Hefe aufgetaut. Dieses Verfahren wiederholt man noch dreimal. Dann sind die Zellen aufgeschlossen und können nach Bedarf durch dreimaliges Auswaschen mit der doppelten Menge dest. Wasser an Cofaktoren verarmt werden. Die Hefezellen werden schliesslich in 10 ml Phosphatpuffer pH 7.0 suspendiert.

2) Hefemacerationssaft nach Lebedew

Luftgetrocknete Bäckerhefe wird mit der dreifachen Menge M/15 sec. Natriumphosphat zwei Stunden bei 37°C im Thermostaten inkubiert. Nach einer weiteren Stunde Stehens bei Raumtemperatur wird der Heferückstand abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand enthält 8-15 mg Protein/ml.

3) Vorschrift zur Reinigung von Thiosulfatdesulphydrase und Rhodanese der Bäckerhefe

a) Aufschluss der Hefe mit Essigester: 1 kg ungespreste Bäckerhefe (Oberkotzau) wird bei Raumtemperatur mit 140 ml dest. Äthylacetat innig verrührt. Nach wenigen Minuten ver-

flüssigt sich die Hefe, und eine intensive Gärung setzt ein. Das Gemisch bleibt eine Stunde bei Raumtemperatur stehen. Es wird sodann eine Stunde im Kühlraum mit 5 l destilliertem Wasser gerührt, dabei sorgt man durch Zutropfen von 4 n Ammoniak für ein pH zwischen 7 und 8. Nach einer Stunde wird die Hefe abzentrifugiert und der wässrige Überstand verworfen. Der Heferückstand wird noch einmal in der gleichen Weise gewaschen. Dann wird die Hefe 15 - 18 Stunden im Kühlraum mit 1000 ml 10 prozentiger Ammoniumsulfatlösung extrahiert. Nach dieser Zeit werden die Zellrückstände abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand, welcher das Enzym in hoher Aktivität enthält, wird zur Entfernung des Ammoniumsulfats 8 - 10 Stunden nach Kunitz⁸³⁾ gegen störendes destilliertes Wasser (120 l) dialysiert. Nach Abzentrifugieren von wenig denaturiertem Protein erhält man eine klare, durch Cytochrom c leicht rosa gefärbte, sehr verdünnte Proteinlösung. Durch Lyophilisation gewinnt man aus dieser das Enzymtrockenpulver.

b) 1. Reinigungsschritt über Amberlite IRC 50 XE 64:
Für die weitere Reinigung kann man von der verdünnten Proteinlösung ausgehen und auf die Gefriertrocknung verzichten. Man lässt sodann innerhalb von 2 St. 1100 ml des dialysierten Ammoniumsulfat-Extraktes durch eine Säule (Durchmesser ca. 2 cm) mit 60 ml Amberlite XE 64 laufen, welches vorher mit M/200 Phosphatpuffer pH 6.0 - 6.2 exquibriert wurde. Die durchlaufende Lösung enthält so gut wie keine Rhodanese- und Thiosulfatdesulhydraseaktivität. Man eluiert sodann mit M/2 Phosphatpuffer pH 5.0 etwa 1/3 des adsorbierten Proteins (s. Abb. 32, S.). Auch diese Fraktion enthält keine Aktivität. Wenn das Eluat kein Protein mehr enthält, wird die aktive Fraktion mit M/1 K-Phosphatpuffer pH 5.0 vom Austauschergel gelöst. Das Filtrat wird in Fraktionen zu 20 ml aufgefangen und getestet. Die aktiven Fraktionen werden vereinigt und ergeben 185 ml. Diese Lösung des Enzyms wird zur Entfernung des Phosphats gegen 50 l destillierten Wassers nach Kunitz⁸³⁾ dialysiert. Nach

der Dialyse beträgt das Volumen 250 ml.

c) Aufkonzentrieren des Enzyms an Amberlite XE 64:

250 ml dialysiertes aktives Amberlite-Eluat durchlaufen eine Säule mit 10 ml Amberlite XE 64, equilibriert mit M/200 Phosphatpuffer pH 5.0. Die gesamte Aktivität bleibt am Austauscher haften. Sie wird mit M/1 K_2HPO_4 -Lösung eluiert. Das Volumen ist auf 35 ml eingengt. Die konzentrierte Enzymlösung wird erst gegen 50 l dest. Wasser, dann gegen 20 l M/200 sec. K-phosphat dialysiert. Nach der Dialyse beträgt das Volumen 45 ml.

d) 2. Reinigungsschritt an DEAE-Cellulose:

Das Enzym wird darauf an einer Säule mit 18 ml DEAE-Cellulose, welche mit M/200 sec. Phosphat equilibriert wurde, adsorbiert. Die durchlaufende Lösung enthält nur minimale Aktivität. Es wird der Reihe nach mit 20 ml M/200 sec. K-Phosphat, 30 ml M/100 sec. K-Phosphat, 50 ml M/50 K-Phosphat pH 7.5 und schliesslich mit 60 ml M/25 K-Phosphat pH 7.5 eluiert. Die aufgefangenen Fraktionen besitzen ein Volumen von 10 ml. Die Rhodanese erscheint erst nach Elution mit M/25 Phosphat pH 7.5. Man erhält das Enzym in 4 Fraktionen von unterschiedlicher spezifischer Aktivität. Protein wurde durch Messen der Absorption bei 280 und 260 bestimmt. Auch die Fraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität ist noch mit Cytochrom c verunreinigt, das sich durch die Absorptionsbanden bei 550, 520 und 420 μ zu erkennen gibt. Der Quotient der Lichtabsorption bei 550 und 280 μ = E_{550}/E_{280} beträgt 0.078. In der nachstehenden Tabelle 11 (siehe nächste Seite) wurde die Reinigung des Enzyms schematisch zusammengefasst.

Tabelle 11

Reinigungs- stufe	ml	E ₂₈₀	E ₂₆₀	Gesamt- aktivität	spez. Ak- tivität	Aus- beute
dialys.AS-Extr.	1100	642	750	26000	37	0
dialys.Amber- lite Eluat	250	455	363	15000	131	58.0%
DEAE Fr.12	10	287	182	600	320	2.3
DEAE-Fr.13	10	315	195	1950	620	7.5
DEAE Fr.14	10	450	255	1720	382	6.6
DEAE-Fr.15	10	215	124	640	288	2.5

4) Vorschrift zur Anreicherung der Sulfitreduktase

a) Aufschluss der Hefezellen:

15 g Bäckerhefe (Oberkotzau) werden mit 30 g Reflexperlen Nr.8 und 16 ml M/10 K₂HPO₄ vermischt. In einer Duranglasflasche wird das Gemisch 1 Minute im Zellhomogenisator von Merckenschlager, Schlossmann und Kurz (loc.cit.) unter Kühlung mit CO₂-Schnee geschüttelt. Der Zellbrei wird von den Glasperlen in einen Zentrifugenbecher abdekantiert. Diese werden noch zwei mal mit jeweils 5 ml M/10 K-Phosphatpuffer pH 7.0 nachgewaschen. Dem Homogenisat werden ferner 3 ml M/10 K-trilonat zugesetzt. Sodann wird 20 Min. bei 14000 U/M auf Phywe-Zentrifuge gefahren.

Alle Arbeiten werden bei 0 - 4°C im Kühlraum durchgeführt. Man gewinnt 23 ml Überstand = Rohextrakt.

b) Protaminsulfat-Fällung: Zu 23 ml Rohextrakt gibt man unter schnellem Rühren in kurzer Tropfenfolge 4.3 ml 2 prozentige Protaminsulfat-Lösung. Anschliessend zentrifugiert man 20 Min. auf der Phywe-Zentrifuge bei 14000 U/M. Der Niederschlag enthält nur wenig Aktivität und wird verworfen. Das

Volumen des Überstandes beträgt 25 ml (= PS-Überstand).

c) Fraktionierung mit Ammoniumsulfat: Die Fraktionierung erfolgt mit bei 0°C gesättigter Ammoniumsulfatlösung, welche mit NH_3 auf pH 7.0 - 7.5 eingestellt wurde; sie enthält ferner M/1000 Trilon B. 20 ml PS-Überstand werden unter Rühren mit 13 ml (= 39.5%) Ammoniumsulfatlösung versetzt. Man lässt diese aus einer Bürette innerhalb von 10 - 15 Min. zutropfen. Die Fällung wird sogleich abzentrifugiert. Man fährt 10 Min. bei 14000 U/M auf der Phywe-Zentrifuge. Der Niederschlag enthält keine Aktivität.

Zum Überstand lässt man in der gleichen Weise weitere 7.0 ml Ammoniumsulfatlösung zutropfen (entspr. 50% Sttg.) . Der Niederschlag wird unverzüglich abzentrifugiert (wie oben) und mit 1 ml M/100 Phosphatpuffer pH 7.0 aufgenommen; er enthält etwa 10 der Aktivität; die spez. Aktivität beträgt $3.34 \cdot 10^{-3}$ Einh/mg.

Zum Überstand der 2. Ammoniumsulfat-Fraktion gibt man weitere 6.0 ml (entspr. 56.5%) Ammoniumsulfatlösung. Der Niederschlag wird wie oben abzentrifugiert und mit 1 ml M/100 Phosphatpuffer pH 7.0 aufgenommen. Er enthält 41 Prozent der Aktivität berechnet auf die Ausgangsmenge PS-Überstand. Die spezifische Aktivität beträgt $9.8 \cdot 10^{-3}$.

Durch Fällung einer weiteren Proteinfraction mit Ammoniumsulfat überzeugt man sich davon, dass keine weitere Aktivität mehr ausfällt.

Tabelle 12 (siehe nächste Seite) gibt einen Überblick über die Anreicherung.

Tabelle 12

Stufe	ml	totale Einh.	mg/ml Protein	spez. Aktivität	%Aus- beute
Roh- extrakt	25.0	1.71	infolge Trü- bung nicht messbar	ca. $0.4-0.5 \cdot 10^{-3}$	0
PS-Über- stand	25.0	1.39	24.8	$2.24 \cdot 10^{-3}$	81.0
AS ₁	1.1	0.145	39.4	$3.34 \cdot 10^{-3}$	8.5
AS ₂	1.1	0.57	52.4	$9.8 \cdot 10^{-3}$	33.4

D. Zusammenfassung

1. Die Bildung von Schwefelwasserstoff aus Thiosulfat und Sulfit durch zellfreie Extrakte der Bäckerhefe wurde untersucht und die beteiligten Enzyme Thiosulfatdesulphydrase und Sulfitreduktase isoliert.
2. Thiosulfatdesulphydrase katalysiert die reduktive Spaltung von Thiosulfat in Schwefelwasserstoff und Sulfit, wobei SH-Verbindungen wie Cystein oder Glutathion den nötigen Wasserstoff liefern. Die Stöchiometrie der Reaktion



wurde bewiesen.

3. Cysteinsulfosäure resp. Glutathionsulfosäure konnte als Zwischenprodukt der enzymatischen Reaktion ausgeschlossen werden. In Anlehnung an andere Autoren wird die Bildung eines intermediären Enzym-Schwefel-Komplexes diskutiert.
4. Thiosulfatdesulphydrase steht in naher Beziehung zur Hefe-Rhodanese. Die beiden Enzyme wurden miteinander verglichen und ihre Michaelis-Konstanten bestimmt. Die Identität dieser Enzyme ist nicht ausgeschlossen.
5. Aus Bäckerhefeextrakten wurde ein Sulfit reduzierendes Enzym etwa 20 fach angereichert. Die Sulfitreduktase überträgt den Wasserstoff des reduzierten Triphosphopyridinnucleotids auf Sulfit, wobei Schwefelwasserstoff entsteht.
6. Die Übertragung des Wasserstoffs kann in einem optischen Test verfolgt werden.
7. Die enzymatische Reduktion des Sulfits zu Schwefelwasserstoff verläuft nicht über Thiosulfat. Ein Reaktionsmechanismus wird diskutiert.

Literaturverzeichnis

- 1) Wiberg, E. : "Die chemische Affinität", S.225
de Gruyter 1951, Berlin
- 2) Hilz, H. : Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 41 880 (1955)
Lipmann, F.
- 3) Bandurski, R.S. : J.Amer.Chem.Soc. 78, 6408 (1956)
Wilson, L.G.
Squires, C.L.
- 4) Robbins, P.W. : J.Amer.Chem.Soc. 78, 2652 (1956)
Lipmann, F.
- 5) Robbins, P.W. : J.biol.Chemistry 229, 837 (1957)
Lipmann, F.
- 6) Robbins, P.W. : J.biol.Chemistry, 233, 681, (1958)
Lipmann, F.
- 7) Baddiley, J. : J.Chem.Soc. 1067 (1957)
Buchanan, J.G.
Letters, R.
- 8) Hilz, H. : Biochim.Biophys. Acta 30, 650 (58)
Kittler, M.
- 9) Wilson, L.G. : J.Amer.Chem.Soc. 80, 5576 (1958)
Bandurski, R.S.
- 10) Ishimoto, M. : J.Biochem. 46, 105 (1959)
- 11) Doman, N.G. : Biochemistry translated from Russian,
22, 671 (1957)
- 12) Hockenhull, D.J.D. : Biochim.Biophys.Acta 3, 326 (1949)
- 13) Shepherd, C.J. : J.gen.Microbiol. 15, 29 (1956)
- 14) Horowitz, N.H. : Advances in Genetics 3, 33 (1950)
- 15) Lampen, J.O. : Arch.Biochem.Biophysics 13, 55 (1947)
Roepke, R.R.
Jones, M.J.
- 16) Englesberg, E. : J.Bact. 63, 675
- 17) Roberts, R.B. : "Studies of Biosynthesis in Esche-
Abelson, P.H. : sichia coli"; Carnegie Institution
Cowie, D.B. : of Washington D.C.1955
Bolton, E.T.
Britten, R.J.

- 18) Schlossmann, K. : Dissertation München 1957
- 19) Schlossmann, K. : Biochem.Z. 328, 591 (1957)
Lynen, F.
- 20) Metzler, D.E. : J.Amer.Chem.Soc. 76, 648 (1954)
Ikawa, M.
Snell, E.E.
- 21) Braunstein, A.J. : "Zur Biochemie des Eiweisses", S.162,
Schemjakin, M.M. Berlin: VEB Deutscher Verlag der
Wissenschaften 1956
- 22) Lorch, E. : Diplomarbeit München 1958
- 23) Stetten, D. : J.Biol.Chemistry 144, 501, (1942)
- 24) DuVigneaud, V. : J.Biol.Chemistry 155, 645 (1944)
- 25) Cowie, D.B. : J.Bact. 64, 87 (1952)
Bolton, E.T.
- 26) Bolton, E.T. : J.Bact. 63, 309, (1952)
Cowie, D.B.
Sands, M.K.
- 27) Schwartz, M. : J.Bact. 67, 98 (1954)
Shapiro, S.H.
- 28) Fromageot, C. : Sumner, Myrbäck, "The Enzymes" II,
Part I S.248, Academic Press,
New York 1951
- 29) Chapeville, F. : Biochim. Biophys. Acta 14, 415 (1954)
Fromageot, P.
- 30) Kearney, E.B. : Biochim. Biophys. Acta 11, 270 (1953)
Singer, T.P.
- 31) Fridowich, J. : J.biol.Chemistry 223, 321 (1956)
Handler, P.
- 32) Fridowich, J. : W.D.McElroy, B.Glass, "A Symposium
Handler, P. on Inorganic Nitrogen Metabolism",
S.539, John Kopkins Press, Balti-
more 1956
- 33) Sörbo, B. : Biochim.Biophys.Acta 24, 324 (1957)
- 34) Ragland, J.B. : Arch.Biochem.Biophys. 76, 496 (1958)
Liverman, J.L.

- 35) Beijerinck, M.W. : Zbl.Bact.2.Abt. 6, 205 (1900)
- 36) Buchner - Hahn : "Zymasegärung", S.341 (1903)
- 37) Neuberg : Bio.Z. 67, 111 (1914)
- 38) Steigmann, A. : J.Soc.Chem.Ind. (London) 64, 119 (1945)
- 39) Szczepkowski, T.W. : Nature (London) 182, 934 (1958)
- 40) Stricks, W. : J.Amer.Chem.Soc. 73, 4569 (1951)
Kolthoff, J.M.
- 41) Cecil, R. : Biochem.J. 59, 234 (1955)
Mc Phee, J.R.
- 42) Lebedew, A.v. : Z.physiol.Chem. 73, 447 (1911)
- 43) Okunuki, K. : Nature, 178, 629 (1956)
- 44) Schmidt, M. : Angew. 68, 387 (1956)
- 45) Grant, W.M. : Anal.Chem. 19, 345 (1947)
- 46) Sörbo, B. : Acta Chem.Scand. 12, 1990 (1958)
- 47) Schöberl, A. : Angew. 69, 478 (1957)
Bauer, G.
- 48) Sörbo, B. : Acta Chem.Scand. 7, 1129 (19)
- 49) Lang K. : Bio.Z. 259, 243 (1933)
- 50) Grassmann, W. : Dtsch.med.Wochenschr.76, 333 (1951)
Hannig, K.
Knedel, M.
- 51) Hirs, C.H.W. : in S.P.Colowick und N.O.Kaplan
Methods in Enzymology I 133
Academie Press Inc., Publishers
New York 1955.
- 52) Margoliash, E. : Biochem.J. 56, 529 (1954)
- 53) Neilands, J.B. : J.biol.Chemistry 197, 701 (1952)
- 54) Warburg, O. : "Wasserstoffübertragende Fermente"
Christian, W. S.297, Verlag Dr.Werner Sängers,
Berlin 1948
- 55) Warburg, O. : Bio.Z. 310, 384 (1941)
Christian, W.
- 56) Peterson, E.A. : J.Amer.Chem.Soc.78, 751 (1956)
Sober, H.A.

- 57) Sober, H.A.
Gutter, F.J.
Wyckoff, M.M.
Peterson, E.A. : J.Amer.Chem.Soc. 78, 756 (1956)
- 58) Fehér, F.
Schliep, E.
Weber, H. : Z.Elektrochem. 57, 916 (1953)
- 59) Wiberg, E. : Holleman - Wiberg: "Anorganische Chemie", S.209, De Gruyter, Berlin 1951
- 60) Lorch, E. : persönliche Mitteilung
- 61) Morton, R.K. : Nature (London) 166, 1092 (1950)
- 62) Pfleiderer, G.
Jeckel, D.
Wieland, Th. : Bio.Z. 328, 187, (56)
- 63) Kaplan, N.O.
Ciotti, M. : J.biol.Chemistry 211, 431 (1954)
- 64) San Pietro, A. : J.biol.Chemistry, 217, 579 (1955)
- 65) van Eys, J.
Kaplan, N.O. : J.biol.Chemistry, 228, 305 (57)
- 66) Westheimer, F.H. : W.D.McElroy, B.Glass
"A Symposion on the Mechanism of Enzyme Action", S.355,
John Hopkins Press Baltimore 1954
- 67) Fiedler, H.
Wood, J.L. : J.biol.Chemistry 222, 387 (1956)
- 68) Wood, J.L.
Fiedler, H. : J.biol.Chemistry 205, 231 (1953)
- 69) Kun, E.
Fanshler, D.W. : Biochem., Biophys. Acta 33, 26 (1959)
- 70) Hylin, J.W.
Wood, J.L. : Fed. Proc. 18, Nr.1, 993 S.251,
(1959)
- 71) Kaji, A.
Mc Elroy, W.D. : J.Bact. 77, 630 (1959)
- 72) Ishimoto, M.
Koyama, J.
Nagai, Y. : J.Biochem. 42, 41 (1955)

- 73) Ishimoto, M. : J.Biochem. 44, 233 (1957)
Koyama, J.
- 74) Micheel, F. : Z.physiol.Chem. 265, 266 (1940)
Emde, H.
- 75) Kun, E. : Biochim., Biophys.Acta 25, 135 (57)
- 76) Sprinson, D.B. : J.biol.Chemistry, 164, 417 (1946)
Chargaff, E.
- 77) Lorant, St. : Bio.Z. 228, 300 (1930)
- 78) Fogo, I.K. : Anal.Chem. 21, 237 (1949)
Popowsky, M.
- 79) Boltz, D.F. : Colorimetrie Determination of
Nonmetals, Interscience Publishers,
Inc., New York 1958, S.273
- 80) Sörbo, B. : Biochim.Biophys.Acta 23, 412 (1957)
- 81) Seegmiller, E. : in S.P.Colowick and N.O.Kaplan
"Methods in Enzymologie; I, 511
Academie Press Inc., Publishers,
New York 1955
- 82) Racker, E. : in S.P. Colowick and N.O.Kaplan
"Methods in Enzymology" II, 722
Academie Press, Inc., Publishers,
New York 1955
- 83) Kunitz, M. : J.Gen.Physiol. 35, 423 (1952)
- 84) Lineweaver, H. : J.Amer.Chem.Soc. 56, 658 (1934)
Burk, D.

L e b e n s l a u f

Am 14. Dezember 1931 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. Albert Lezius und seiner Ehefrau Hildegard geb. Farwick in Mainz geboren.

Nach dreijähriger Grundschulzeit in Heidelberg und Frankfurt a.M. besuchte ich von 1941 bis 1947 mit kriegsbedingter Unterbrechung das humanistische Lessing-Gymnasium in Frankfurt a.M. und von 1947 bis 1951 das Katharineum zu Lübeck, wo ich im März 1951 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1951 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Universität München und legte dort im November 1953 die Diplomchemiker-Vorprüfung ab. Vom Sommersemester 1954 bis zum Sommersemester 1955 verfolgte ich mein Studium an der Universität Basel. Im Wintersemester 1955/56 kehrte ich nach München zurück, wo ich mich im Juli 1956 der Diplomchemiker-Hauptprüfung unterzog.

Unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. F. Lynen verfasste ich von Dezember 1956 bis August 1957 am Max-Planck-Institut für Zellchemie in München meine Diplomarbeit über das Thema "Die biologische Reduktion des Sulfits". Daran anschliessend begann ich mit der vorliegenden Dissertation.

